

Aus dem Institut für Biochemie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der  
dorsalen Hippocampi auf das unkonditionierte,  
soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von  
Mäusen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Monique Radscheidt
aus	Stendal
Magdeburg	2014

## **Bibliographische Beschreibung:**

Radscheidt, Monique:

Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der dorsalen Hippocampi auf das unkontingente, soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen. - 2014. - 58 Bl., 17 Abb., 5 Tab.

## **Kurzreferat**

Das olfaktorische Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis spielt eine wesentliche Rolle im sozialen Gefüge von Labornagern. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des dorsalen Hippocampus für das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen untersucht, wobei zum einen geklärt werden sollte, ob der dorsale Hippocampus bei der Informationsaufnahme (Aquisition), -verarbeitung (Konsolidierung) und / oder beim Wiederabrufen der Information eine wesentliche Rolle spielt. Zum anderen wurde durch die Verabreichung verschiedener Substanzen untersucht, welcher neuronale Mechanismus für die Bildung des olfaktorischen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses wesentlich ist. Durch die intrahippocampale Injektion des Lokalanästhetikums Lidocain wurde eine Natriumkanalblockade induziert, was eine Hemmung der Informationsweiterleitung bedeutet. Durch die intrahippocampale Injektion des Proteinbiosyntheseinhibitors Anisomycin sollte die lokale Informationsverarbeitung gehemmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die intrahippocampale Applikation von NaCl- oder Ringer-Lösung, welche eigentlich als Kontrollsubstanzen dienen sollten, sowohl zum Zeitpunkt der Informationsaufnahme als auch beim Wiederabrufen der Information die Fähigkeit zur sozialen Diskrimination gestört wurde. Durch Zugabe des in NaCl gelösten Lidocains konnte dieser störende Effekt aufgehoben werden. Durch die intrahippocampale Applikation von Anisomycin wurde die Konsolidierung, nicht aber das Abrufen der olfaktorischen Information gehemmt.

*Meinen Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>S.1</b>
1.1. Gedächtnis und Hippocampus	S.1
1.2. Soziale Diskrimination bei Nagetieren	S.3
1.3. Ausgewählte Methoden zur temporären Hippocampusläsion	S.5
1.4. Ziel der Arbeit	S.6
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>S.8</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>S.8</b>
2.1.1. Tiere	S.8
2.1.2. Geräte, Chemikalien, Puffer, Lösungen	S.8
<b>2.2. Methoden</b>	<b>S.8</b>
2.2.1. Soziale Diskrimination / Verhaltensanalyse	S.8
2.2.2. Stereotaktische Operation	S.10
2.2.3. Charakterisierung der postoperativen Erholung / Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der Versuchstiere	S.11
2.2.4. Lokale intrahippocampale Injektion	S.12
2.2.5. Histologie / Mikroskopie	S.14
<b>2.3. Experimente</b>	<b>S.14</b>
2.3.1. Soziale Diskrimination vor und nach der Operation	S.14
2.3.2. Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase / Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der Versuchstiere	S.15
<b>2.3.3. Injektionsexperimente</b>	<b>S.15</b>
2.3.3.1. Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S.15
2.3.3.2. Injektion von Anisomycin <i>versus</i> Ringer-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S.16
2.3.3.3. Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung drei Stunden vor <i>Sampling</i>	S.17
2.3.3.4. Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung drei Stunden vor <i>Choice</i>	S.18
<b>2.3.4. Statistische Analyse der Daten</b>	<b>S.19</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>S.20</b>
<b>3.1 Soziale Diskrimination vor und nach der Operation</b>	<b>S.20</b>
<b>3.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase /         Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der         Versuchstiere</b>	<b>S.21</b>

<b>3.3 Injektionsexperimente</b>	<b>S.24</b>
3.3.1 Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S.24
3.3.2 Injektion von Anisomycin <i>versus</i> Ringer-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S.25
3.3.3 Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung drei Stunden vor <i>Sampling</i>	S.26
3.3.4 Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung drei Stunden vor <i>Choice</i>	S.27
3.3.5 Überprüfung der Fähigkeit zur sozialen Diskrimination nach mindestens einer Injektion	S.28
<b>3.4 Histologie</b>	<b>S.28</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>S.30</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>S.41</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>S.42</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>S.45</b>
7.1 Materialien	S.45
7.1.1 Chemikalien	S.45
7.1.2 Puffer, Lösungen	S.46
7.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör	S.46
7.1.4 Computerprogramme	S.47
7.2 Tabellen	S.48
7.2.1 Darstellung der Untersuchungszeiten für die einzelnen Versuche	S.48
<b>Danksagungen</b>	<b>VIII</b>
<b>Ehrenerklärung</b>	<b>IX</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges</b>	<b>X</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AOS	akzessorisches olfaktorisches System
c-Fos	zelluläres Homolog des murinen Finkel, Biskis, Jinkins Osteosarcomavirus
CA	Cornu ammonis
DA	Dopamin
GABA	Gamma-aminobutyric acid (Gamma-Aminobuttersäure)
J1	Jungtier 1
J2	Jungtier 2
JT	Jungtier
HOS	hauptolfaktorisches System
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NAME	Nuclei amygdalae medialis
NE	Norepinephrin
Op	Operation
SFM	Standardfehler der Mittelwerte
VT	Versuchstier

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.1:</b>	Ablauf der experimentellen Durchführung des Tests zur sozialen Diskrimination:	S. 9
<b>Abb.2:</b>	Isoflurannarkose	S. 13
<b>Abb.3:</b>	Schema zur Darstellung des Ablaufs der Injektion unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S. 16
<b>Abb.4:</b>	Schema zur Darstellung des Ablaufs der Injektion 30 Minuten vor <i>Sampling</i>	S. 17
<b>Abb.5:</b>	Schema zur Darstellung der Injektion drei Stunden vor <i>Sampling</i>	S. 18
<b>Abb.6:</b>	Schema zur Darstellung der Injektion drei Stunden vor <i>Choice</i>	S. 19
<b>Abb.7:</b>	Untersuchungsdauer im <i>Choice</i> vor und nach <i>Op</i>	S. 20
<b>Abb.8:</b>	Entwicklung der Körpermasse nach der <i>Op</i>	S. 22
<b>Abb.9:</b>	Entwicklung der Untersuchungsdauer nach der <i>Op</i>	S. 22
<b>Abb.10:</b>	Dauer von Aggressivitäts-/Sexualverhalten	S. 23
<b>Abb.11:</b>	Untersuchungsdauer und Dauer des Aggressivitäts-/Sexualverhaltens gegenüber Jungtieren der beiden Geschlechter	S. 23
<b>Abb.12:</b>	Untersuchungsdauer im <i>Choice</i> nach Injektion von NaCl- vs. Lidocain-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S. 24
<b>Abb.13:</b>	Untersuchungsdauer im <i>Choice</i> nach Injektion von Ringer- vs. Anisomycin-Lösung unmittelbar vor <i>Sampling</i>	S. 25
<b>Abb.14:</b>	Untersuchungsdauer im <i>Choice</i> nach Injektion von NaCl- vs. Anisomycin-Lösung drei Stunden vor <i>Sampling</i>	S. 26
<b>Abb.15:</b>	<i>Untersuchungsdauer im Choice</i> nach Injektion von NaCl- vs. Anisomycin-Lösung drei Stunden vor <i>Choice</i>	S. 27
<b>Abb.16:</b>	Untersuchungsdauer im <i>Choice</i> nach mindestens einer Injektion	S. 28
<b>Abb.17:</b>	Repräsentative Mikrophotographien von nach Nissl gefärbter Schnittpräparate verschiedener Versuchstiere im Bereich des dorsalen Hippocampus nach den Injektionsexperimenten	S. 29

# 1. Einleitung

## 1.1 Gedächtnis und Hippocampus

Seit der systematischen Untersuchung menschlicher Gedächtnisleistungen durch Hermann Ebbinghaus (1885) unterscheidet man zwei Gedächtnistypen, die auf dem bewussten *versus* unbewussten Zugriff auf den Gedächtnisinhalt während des Abrufens beruhen: Zum einen das sogenannte deklarative (explizite) Gedächtnis. Dieses dient dazu, Fakten bzw. Assoziationen zwischen Objekten der Umwelt im Gedächtnis abzuspeichern und in unterschiedlichen Situationen bewusst wieder abzurufen. Und zum anderen das nicht-deklarative (auch prozedurale, implizite) Gedächtnis. In letzterem sind konkrete Verhaltensweisen für entsprechende Situationen gespeichert. Diese Informationen werden jedoch anders als beim deklarativen Gedächtnis nur in definierten Situationen unbewusst abgerufen (Eichenbaum et al. 1986). Zu den originären Leistungen des deklarativen Gedächtnisses gehört auch die Unterscheidung zwischen „bekannt“ und „neu“, die das Wiedererkennungsgedächtnis charakterisiert. Auf dieser Unterscheidung beruht auch die olfaktorische Diskrimination, also die Unterscheidung von Geruchsstoffen. Sie ist ein Gegenstand dieser Arbeit und wird später näher erläutert. Hauptspeicherort des deklarativen Gedächtnisses ist der gesamte Neokortex, wobei der Hippocampus wesentlich an der Gedächtnisbildung beteiligt zu sein scheint (Bunsey et al. 1995, Eichenbaum 1996).

Der Hippocampus als Teil des limbischen Systems ist ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit. Neben dem Hippocampus werden weitere anatomische Strukturen zum limbischen System gezählt, welche über Faserverbindungen miteinander kommunizieren und laut verschiedener Autoren nicht nur eine anatomische sondern auch eine funktionelle Einheit bilden. Das limbische System spielt nicht nur bei der Entstehung von Emotionen und Triebverhalten sondern auch für die Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle. Zu dessen anatomischen Strukturen gehören neben dem Hippocampus die Amygdala, der *Gyrus cinguli*, das Septum sowie der entorhinale Kortex (Douglas 1967). Aus zahlreichen Untersuchungen, welche sowohl Experimente mit Labornagern und Affen als auch klinische Studien beim Menschen umfassen, ist bekannt, dass der Hippocampus spezieübergreifend kausal in die Generierung (besonders deklarativer) Langzeit-Gedächtnisleistungen einbezogen ist (Scoville et al. 1957, Bunsey & Eichenbaum 1995, Kogan et al. 2000, Lai et al. 2005).



Die hippocampale Formation liegt beim Menschen im medialen Temporallappen und zieht sich schlauchförmig von ventral nach rostral. Man unterscheidet hierbei drei Regionen bzw. Abschnitte des Hippocampus, das *Subiculum*, das *Cornu ammonis*, welches unterteilt ist in die Regionen CA1 bis CA4, und den *Gyrus dentatus*. Während die CA1-Region als eine Art Ausgang angesehen wird, über welchen Informationen vom Hippocampus zu anderen Hirnarealen weitergeleitet werden, ist die CA3-Region für die intrahippocampale Informationsverarbeitung von Bedeutung (Daumas et al. 2005). Die Informationen gelangen in den Hippocampus zum einen über das Septum aus niederen Hirnarealen und zum anderen über das *Subiculum* aus höheren neokortikalen Regionen (Douglas 1967). Eine der Hypothesen über die Funktion des Hippocampus als integrierendes Zentrum von Gedächtnisleistungen vermutet, dass Informationen der Umwelt, die aus vielen verschiedenen Sinneseindrücken (Modalitäten) zusammengesetzt sind, über Fasern des *Gyrus cinguli* im Kortex repräsentiert werden. Dieses noch unverarbeitete Bild, das aus sogenannten „elementaren Repräsentationen“ (Rudy et al. 2005) besteht, würde jedoch sehr chaotisch erscheinen, so dass es zunächst eine weitere Verarbeitung durchlaufen muss, die zur Bildung von „Kategorien“ führt, mithin zu komplexen Assoziationen der elementaren Repräsentationen, die eine neue Qualität an Information bedeuten. Dazu – so wird vermutet – gelangen die Informationen über die elementaren Repräsentationen vom Kortex über die parahippocampale Region zum Hippocampus (Eichenbaum 1996). Hier findet mutmaßlich die Kategoriebildung statt (Vann und Albasser 2011), wobei angenommen wird, dass im dorsalen Hippocampus zeitliche bzw. räumliche Assoziationen (Wallenstein et al. 1998) hergestellt werden, während im ventralen Hippocampus emotionale und/oder motivationale Komponenten einfließen (Bannermann et al. 2003, Calfa et al. 2007). Vom Hippocampus gelangt die Information über diese Kategorien, auch als „konjunktive Repräsentationen“ (Rudy et al. 2005) bezeichnet, wieder über die parahippocampale Region zurück zum Kortex, wo sie gespeichert wird (Eichenbaum 1996).

## 1.2 Soziale Diskrimination bei Nagetieren

Die Tiere der meisten Säugetierarten leben – zumindest zeitweise - in Gruppen, wobei die individuelle Erkennung von Artgenossen eine kritische Rolle für die Stabilität und Dynamik im sozialen Gefüge spielt. Insbesondere Labornager zeigen eine ausgeprägte Neigung Artgenossen olfaktorisch zu untersuchen, wodurch sie deren „Geruch“ aufnehmen (Thor & Holloway 1982). Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass Nager ein sogenanntes „soziales Wiedererkennungsgedächtnis“ besitzen, das heißt die Fähigkeit, Artgenossen voneinander unterscheiden und möglicherweise sogar individuell erkennen zu können. Man geht davon aus, dass dieses Gedächtnis auf dem Erlernen sogenannter „olfaktorischer Signaturen“ beruht. Dabei besteht die „olfaktorische Signatur“ eines Nagetieres aus dem individuellen Duftstoffbukett, das sowohl volatile als auch nicht-volatile Bestandteile enthält. Unter Laborbedingungen kann das soziale Wiedererkennungsgedächtnis mit Hilfe eines von Thor und Holloway (1982) entwickelten und von Engelmann und Kollegen (1995, 2011) modifizierten Tests untersucht werden. Diesem Test liegt das den Tieren angeborene Verhalten zu Grunde, unbekannte Artgenossen länger zu untersuchen als bekannte. Bei diesem Test wird dem Versuchstier zum Kennenlernen während des sogenannten *Samplings* ein Jungtier für eine bestimmte Zeitspanne präsentiert. Gemessen wird die Zeit, die das Versuchstier aufwendet, um das Jungtier zu untersuchen. Im Falle der Überprüfung des Langzeit-Gedächtnisses wird nach 24 Stunden dem Versuchstier während des sogenannten *Choice* dasselbe Jungtier zusammen mit einem weiteren, unbekannten Jungtier präsentiert. Auch hier wird die Dauer gemessen, die das bekannte und das unbekannte Jungtier durch das Versuchstier untersucht werden. Eine signifikant längere Untersuchungszeit des unbekannten Jungtiers während des *Choice* gilt als Maß für soziale Wiedererkennung.

Eine grundlegende Studie zum Thema soziale Wiedererkennung bei in Gruppen gehaltenen Mäusen wurde von Kogan und Kollegen (2000) veröffentlicht. In ihr wird beschrieben, dass ein intaktes soziales Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von einem ungestörten Ablauf von Proteinbiosyntheseprozessen abzuhängen scheint (Kogan et al. 2000). In derselben Studie wurde anhand von permanenten Läsionen zudem gezeigt, dass die hippocampale Formation eine entscheidende Rolle bei der Bildung dieses Langzeit-Gedächtnisses spielt. In später erschienenen Publikationen

wurde der Proteinbiosynthese-Inhibitor Anisomycin zu verschiedenen Zeitpunkten des olfaktorischen Wiedererkennungstestes systemisch injiziert. So wurde nachgewiesen, dass wenigstens zwei Phasen der Proteinbiosynthese zur Bildung eines olfaktorischen Langzeit-Gedächtnisses nötig sind (Richter et al. 2005, Wanisch et al. 2008). Die Bildung des Langzeit-Gedächtnisses wurde gehemmt, wenn die Anisomycininjektionen nicht nur unmittelbar, sondern auch sechs Stunden nach dem *Sampling* erfolgten. Weiterhin wurden Untersuchungen zur neuronalen Aktivität mittels Immunhistochemie für c-Fos durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass während der Bildung des Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses die c-Fos Synthese in Hirnstrukturen induziert wird, die sowohl zum akzessorischen olfaktorischen System (AOS) als auch zum hauptolfaktorischen System (HOS) gehören. Das HOS umfasst den *Bulbus olfactorius*, den *Nucleus corticalis* der Amygdala und den piriformen Kortex als Strukturen des limbischen Systems und verarbeitet hauptsächlich Informationen über flüchtige (volatile) olfaktorische Stimuli. Das AOS umfasst den akzessorischen *Bulbus olfactorius*, die *Nuclei amygdalae medialis* (NAME), die Binnenkerne des lateralen olfaktorischen Traktes und der *Stria terminalis*, die mediale preoptische Region und die *Stria terminalis* und verarbeitet Informationen über nicht-volatile Stimuli. Zu den Strukturen, in denen eine Induktion der c-Fos-Synthese beobachtet wurde, zählen - als Teile des AOS - der akzessorische *Bulbus olfactorius*, die NAME und die mediale präoptische Region. In zum MOS zugehörige Hirnareale wurde eine Induktion der c-Fos-Synthese im piriformen Kortex festgestellt. Interessanterweise konnte im dorsalen Hippocampus keine c-Fos-Synthese beobachtet werden (Richter et al. 2005).

Zwar liegen, wie oben dargestellt, Hinweise auf eine Beteiligung des Hippocampus an der Bildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses mittels permanenter Läsionen der gesamten Hippocampusformation vor, doch fehlen einerseits Informationen zum Zeitpunkt der essentiellen Beteiligung des Hippocampus an der Gedächtnisleistung (Akquisition und/oder Konsolidierung und/oder Abrufen) und dem daran beteiligten genauen Anteil des Hippocampus (dorsaler und/oder ventraler). Andererseits lassen auch die Ergebnisse der c-Fos Analysen keinen genauen Rückschluss auf die Bedeutung des dorsalen Hippocampus für das Wiedererkennungsgedächtnis zu.

### 1.3 Ausgewählte Methoden zur temporären Hippocampusläsion

Hippocampusläsionen können mechanisch, neurotoxisch oder mittels Radiofrequenzstrahlung (Ross & Eichenbaum 2006) gesetzt werden. Alle diese Methoden haben jedoch den Nachteil, dass permanente, irreversible Läsionen entstehen. In dieser Arbeit sollten reversible Hippocampusläsionen induziert werden. Theoretisch stehen hierfür verschiedene Substanzgruppen zur Verfügung. Zum einen gibt es die inhibitorischen Transmitter bzw. deren Agonisten, wie z.B. *GABA*, *Glycin* oder *Muscimol* (Noack 2012). Wirkprinzip dieser Substanzen ist eine Hyperpolarisation der Neurone, wodurch die Generierung der Aktionspotentiale am Zellkörper verhindert wird. Voraussetzung ist jedoch, dass sich an den Neuronen auch die entsprechenden Rezeptoren für die inhibitorischen Transmitter befinden. Ein Vorteil der Verwendung von Agonisten inhibitorischer Transmitter ist, dass auch nach mehreren Injektionen kaum Gewebeschäden verursacht werden. Die inhibitorische Wirkung setzt unmittelbar ein und hält einige Sekunden bis mehrere Stunden an, wobei die Blockade durch mehrere nachfolgende Injektionen verlängert werden kann (Malpeli 1999).

Eine weitere potentielle Methode, um eine temporäre Läsion eines Hirnareals zu erzeugen, liefert der Einsatz zweiwertiger Kationen, die eine reversible Blockade durch Hemmung der synaptischen Übertragung induzieren. Zu dieser Substanzklasse zählen beispielsweise Cobalt-, Magnesium- und Mangan-Ionen, die in entsprechenden Salzen gebunden sind. Nach Applikation setzt die Wirkung hier unverzüglich ein, hält aber auch nur einige Sekunden bis wenige Minuten an, so dass kaum Zeit für entsprechende Experimente bleibt. Eine Verlängerung der Blockade durch mehrere nachfolgende Injektionen ist hier nicht möglich, da die zweiwertigen Kationen zu einer ausgeprägten Gewebszerstörung führen können; auch deswegen kommt diese Methode für *In-vivo*-Studien kaum in Frage (Malpeli 1999).

Schließlich können Natriumkanalblocker zur temporären Ausschaltung distinkter Hirnareale eingesetzt werden. Im Gegensatz zu den inhibitorischen Transmittern unterbinden sie die Bildung von Aktionspotentialen sowohl im Zellkörper als auch am Axon der Neurone. Die Wirkung hängt somit nicht vom Vorhandensein spezieller Rezeptoren ab. Zu den Natriumkanalblockern gehören die Lokalanästhetika, wie z.B.

das *Lidocain*. Die Blockade setzt hier sofort ein und hält abhängig von der Dosis, Infusionszeit und dem Infusionsvolumen über viele Minuten an (Malpeli 1999).

Neben Substanzen, die die akute *Informationsweiterleitung* in distinkten Hirnarealen und temporär ausschalten gibt es auch solche, die die *Informationsverarbeitung* im Sinne einer Blockade von intrazellulären Proteinbiosynthesen unterbinden. Hierzu zählt *Anisomycin*, ein Antibiotikum, das an die 60S-Untereinheit von eukaryotischen Ribosomen bindet und somit die Translation, also die Verknüpfung von Aminosäuren zu Peptiden/Proteinen, blockiert. Nach systemischer (subcutaner) Applikation von Anisomycin ist diese hemmende Wirkung für einen Zeitraum von einer halben Stunde bis zu drei Stunden nach Applikation nachweisbar (Wanisch et al. 2008).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass der Hippocampus (insbesondere dessen dorsaler Anteil) eine entscheidende Rolle bei der Generierung des Langzeit-Gedächtnisses spielt (Bunsey & Eichenbaum 1995, Kogan et al. 2000). Diese, in Verhaltensuntersuchungen gewonnenen, Befunde werden jedoch nicht durch die Arbeit von Richter et al. (2005) gestützt, in der mittels Immunhistochemie die c-Fos-Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten während der Konsolidierung eines olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses im Sinne eines „*cellular imaging*“ analysiert wurde.

Zwar konnte, wie bereits beschrieben, eine Induktion der *De-novo*-Proteinsynthese in verschiedenen Hirnstrukturen des AOS sowie MOS nachgewiesen werden. Allerdings wurde keine derartige Beobachtung im dorsalen Hippocampus gemacht (Richter et al. 2005). Somit bestand die Aufgabe, im Rahmen dieser Arbeit herauszufinden, ob - und wenn ja wie - eine temporäre Blockade der Informationsweiterleitung und/oder Informationsverarbeitung im dorsalen Hippocampus die olfaktorische Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisbildung beeinflusst.

In einigen Studien wurde beschrieben, dass die lokale, intrazerebrale Applikation von Natriumkanalblockern andere Formen der Gedächtnisbildung stört (Daumas et al. 2005). Alternativ oder zusätzlich dazu gehen die Autoren anderer Studien von einer essentiellen Beteiligung der *De-novo*-Proteinbiosynthese an der Gedächtnisbildung

aus, wobei es während der Konsolidierung des olfaktorischen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses zumindest zwei Proteinbiosynthesehemmersensible Phasen geben soll (Kogan et al. 2000, Richter et al. 2005, Wanisch et al. 2008). Somit war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob die Bildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses auf *De-novo*-Proteinbiosynthese beruht oder die Information lediglich durch andere neurophysiologische Prozesse in den Neuronen verarbeitet wird und somit Proteinbiosynthese-unabhängig ist.

Wenn der dorsale Hippocampus an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligt ist, galt es als drittes Ziel die Frage zu klären, zu welchem Zeitpunkt (Akquisition und/oder Konsolidierung und/oder Abrufen) dieses Hirnareal von Bedeutung ist.

Um die genannten Fragen zu beantworten, wurden in meinen Untersuchungen die Substanzen Lidocain sowie Anisomycin verwendet, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Lernsession während der mutmaßlichen Konsolidierung des olfaktorischen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses lokal in den dorsalen Hippocampus injiziert wurden. Es ist anzunehmen, dass, wenn die Bildung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses Proteinbiosynthese-abhängig ist, durch Injektion des Proteinbiosynthese-Inhibitors Anisomycin die Konsolidierung desselben gestört werden kann. Unter der Annahme, dass das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis Proteinbiosynthese-unabhängig gebildet würde, wäre eine Störung des olfaktorischen Gedächtnisses durch Injektion eines Natriumkanalblockers, wie z.B. Lidocain zu erwarten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Tiere**

Für die Experimente wurden 103 adulte männliche C57BL/6JOlaHsd-Mäuse als Versuchstiere sowie Jungtiere der gleichen Zucht im Alter zwischen 25 und 35 Tagen verwendet. Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät Magdeburg gezüchtet. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 3-5 Tieren gehalten und circa zwei Stunden vor Beginn der Experimente isoliert. Auch die Jungtiere wurden frühestens zwei Stunden vor Beginn der Experimente aus ihren Heimkäfigen, in denen auch die Eltern- und Geschwistertiere saßen, entnommen und einzeln in die Versuchskäfige gesetzt (*siehe Anhang 7.1.3 für Abmessungen der Käfige*). Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter pathogen-freien Bedingungen mit kontrolliertem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden bei konstanter Raumtemperatur gehalten.

#### **2.1.2 Geräte, Chemikalien, Puffer, Lösungen**

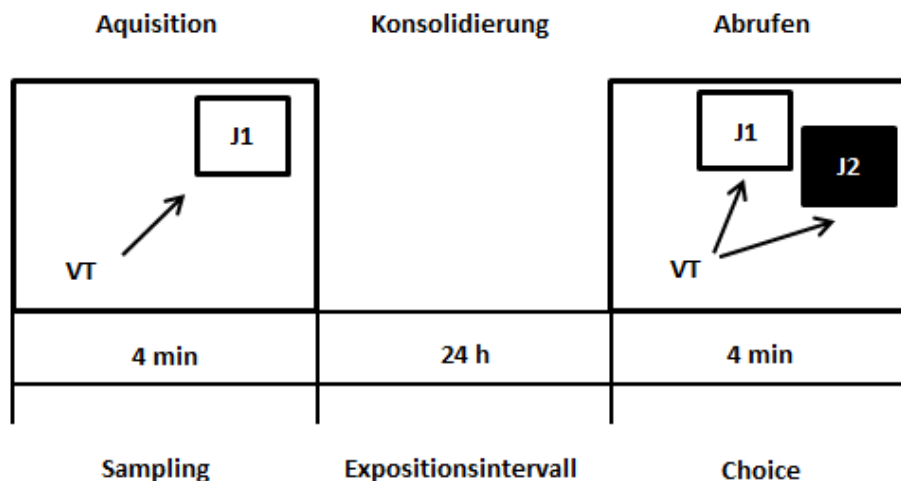
Alle Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen sowie deren Hersteller/Lieferanten sind im Anhang aufgelistet und beschrieben.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Soziale Diskrimination / Verhaltensanalyse**

Die Versuchstiere wurden circa zwei Stunden vor dem Diskriminationstest in einen frischen Versuchskäfig isoliert. Der soziale Diskriminationstest wurde nach der Methode von Engelmann et al. (2011) durchgeführt. Er besteht aus zwei vierminütigen Expositionen, während derer den Versuchstieren Jungtiere als olfaktorische Stimuli präsentiert wurden (**Abb.1**). Während der ersten Exposition, dem sogenannten *Sampling*, wurde dem Versuchstier ein Jungtier (J1) in den Versuchskäfig gesetzt und die Zeit gemessen, die das Versuchstier das Jungtier untersucht. Anschließend wurden die Versuchstiere für 24 Stunden

(Expositionsintervall EI) isoliert in den Versuchskäfigen belassen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Umgebung nicht verändert wurde. Während der zweiten Exposition, dem sogenannten *Choice* wurden dem Versuchstier gleichzeitig J1 sowie ein weiteres unbekanntes Jungtier (J2) präsentiert. Während beider Expositionen (*Sampling* und *Choice*) wurde jeweils die Dauer des direkten Kontaktes („Beschnüffeln“ und „Belecken“) des Versuchstieres mit den einzelnen Jungtieren (Untersuchungsdauer) sowie die Dauer des Aggressions- bzw. Sexualverhaltens gegenüber den jeweiligen Jungtieren mit Hilfe eines Computerprogramms (EVENTLOG, siehe Anhang 7.1.4) erfasst. Zur optischen Unterscheidung der Jungtiere wurde abwechselnd J1 oder J2 mit einem grünen geruchslosen Farbstift (Edding) am Schwanz und Kopf markiert.



**Abb. 1:** Ablauf der experimentellen Durchführung des Tests zur sozialen Diskrimination: Während des vierminütigen Samplings wurde dem Versuchstier (VT) zunächst ein Jungtier (J1) präsentiert. Nach einem Expositionsintervall von 24 Stunden folgte das sogenannte Choice. Hier wurden dem Versuchstier das schon im Sampling exponierte J1 gemeinsam mit dem bislang unbekannten Jungtier (J2) für vier Minuten präsentiert. Während Sampling und Choice wird von einem erfahrenen Experimentator jeweils die Zeit gemessen, die das VT J1 und J2 olfaktorisch untersucht (Schnüffeln, Lecken).



### 2.2.2 Stereotaktische Operation

Für die stereotaktische Operation (Op) wurden die Versuchstiere zunächst narkotisiert. Dazu wurden sie für wenige Sekunden in einen Behälter mit Isofluran gesetzt. Isofluran ist ein Anästhetikum, welches sehr schnell wieder abgeatmet wird, sodass die hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung innerhalb von wenigen Sekunden wieder nachlässt. Diese Zeit wurde genutzt, um den Versuchstieren die Lösung für eine tiefe Narkose (0,1ml/10g Körpermasse) intraperitoneal zu applizieren (*siehe Anhang, 7.1.2 Puffer und Lösungen*). Dabei wurden 0,1 ml pro 10 g Körpermasse injiziert. Die Wirkung des Narkosegemisches setzt innerhalb von drei bis fünf Minuten ein und hält etwa sechs bis acht Stunden an. Vor der Op wurde den Versuchstieren weiterhin das Analgetikum Metacam subcutan appliziert (Wanisch & Wotjak 2008). Dieses reduziert die postoperativen Schmerzen und wirkt aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaft positiv auf den Heilungsprozess der Operationswunde (Boehringer Ingelheim, Produktinformation 2006). Für die Op wurden die narkotisierten Versuchstiere in einen stereotaktischen Apparat fixiert. Anschließend wurden die Haare am Kopf mit einer Schere entfernt, mit einem Skalpell ein Hautschnitt gesetzt und die Schädeldecke freipräpariert. Danach wurde auf die Schädeldecke ein Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) gegeben und mit einem Wattestäbchen so auf der Schädeldecke verrieben, dass das Bregma gut sichtbar war. Ausgehend vom Bregma wurden anhand eines stereotaktischen Atlanten (Franklin & Paxinos 1997) folgende Koordinaten aufgesucht:

- lateral: +1,3 / -1,3 mm
- posterior: +2 mm

An diesen Koordinaten wurden mit einem Zahnbohrer Löcher in die Schädeldecke gebohrt und bilateral je eine 9 mm lange Führungskanüle (*Dimensionen siehe Anhang, 7.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör*) implantiert. Die Führungskanülen wurden an beiden Punkten bis zur ventralen Koordinate +0,8 mm vorgeschoben, so dass der tiefste Punkt der Führungskanüle im dorsalen Hippocampus lag. Neben diesen Positionen wurden bilateral zwei weitere Löcher in die Schädeldecke gebohrt, um in diesen jeweils eine kleine, rostfreie Uhrmacherschraube zu befestigen. Diese dienten später der besseren Fixierung der Führungskanülen an der Schädeldecke. Nach dem Auftragen von einem Tropfen

Histoacryl-Gewebekleber wurden die Führungskanülen und Schrauben untereinander und mit denen der jeweils kontralateralen Hemisphäre und mit dem Schädelknochen durch lichthärtenden Zahnzement verbunden. Die Wunde wurde anschließend mit Refobacin-Creme versorgt. Diese enthält den Wirkstoff Gentamicin, welcher antibiotisch wirkt und somit einer Wundinfektion vorbeugen sollte. In die Führungskanülen wurden Mandrins eingeführt, um die Gefahr des Verstopfens durch Blut oder Einstreu zu minimieren. Die Versuchstiere wurden für 24 Stunden zur Erholung isoliert gehalten und anschließend in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgesetzt.

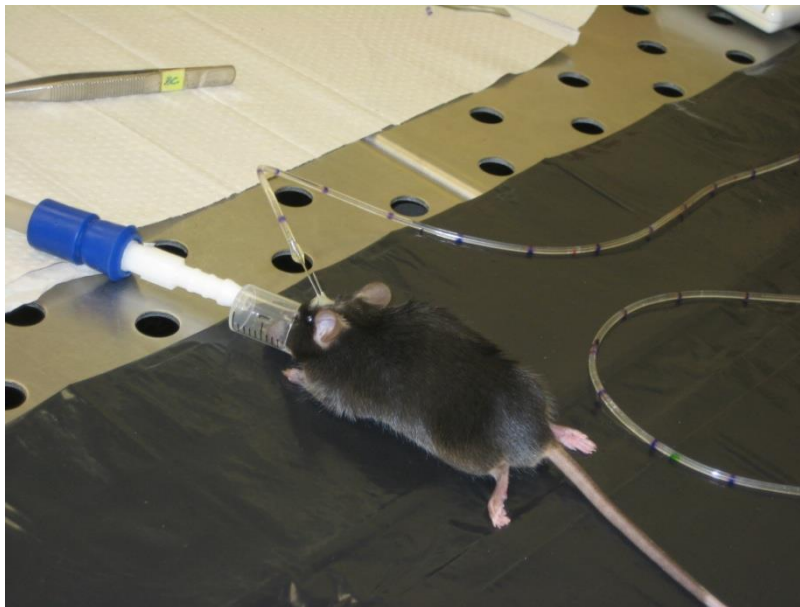
### **2.2.3 Charakterisierung der postoperativen Erholung / Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der Versuchstiere**

Es wurde untersucht, welche Konsequenz die Op auf die Körpermasse, auf die Untersuchungsdauer, das Aggressivitäts- und Sexualverhalten sowie auf die Fähigkeit zur sozialen Diskrimination hat. Weiterhin sollte überprüft werden, nach welcher Zeit die Messwerte für Körpermasse und Untersuchungsdauer wieder in etwa den Werten vor der Op entsprechen, so dass der Zeitpunkt der nächsten Experimente für die Versuchstiere bestimmt werden konnte. Während der ersten sieben Tage nach der Op wurden einmal täglich Körpermasse, Untersuchungsdauer sowie Aggressivitäts- und Sexualverhalten gegenüber einem JT gemessen. Die Messung der Untersuchungsdauer sowie des Aggressivitäts- und Sexualverhaltens wurden wie beim *Sampling* durchgeführt. Weiterhin wurden die Untersuchungsdauer sowie das Aggressivitäts- und Sexualverhalten gegenüber männlichen und weiblichen Jungtieren im Vergleich untersucht.

## 2.2.4 Lokale intrahippocampale Injektion

Die Injektionsversuche liefen nach dem Doppelt-Blind-Schema ab, d.h. der Experimentator wusste nicht, ob er die Wirksubstanz oder die Kontrollsubstanz injizierte. Zudem wurde das Überkreuz-Schema angewandt, d.h. in der ersten Behandlungswoche bekam die Hälfte der Tiere (Gruppe 1) die Substanz A (z.B. Wirksubstanz) und die andere Hälfte (Gruppe 2) bekam Substanz B (z.B. Kontrollsubstanz). Eine Woche später bekam Gruppe 1 die Substanz B und Gruppe 2 die Substanz A. Erst nach dem Ende der Verhaltensexperimente wurde der Code gebrochen. Die Versuchstiere wurden mit einer kontinuierlichen Isoflurangaszufuhr über eine Atemmaske narkotisiert. Die Atemmaske wurde, wie in **Abbildung 2** wiedergegeben, aus einer aufgeschnittenen Plastikspritze konstruiert, an der ein Gummischlauch befestigt war, über den das Narkosegas zugeleitet wurde. Während die Versuchstiere durch das Isoflurangas kurz narkotisiert und muskelrelaxiert waren, wurden die Injektionskanülen (*Dimensionen siehe Anhang, 7.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör*) in die Führungskanülen geschoben. Die Injektionskanülen waren jeweils mit einem Plastikschauch verbunden. Der Plastikschauch wurde zuvor mit Kochsalzlösung durchspült, anschließend wurde mit Hilfe einer Spritze eine Luftblase in den Plastikschauch eingesogen und darauf folgend die entsprechende zu injizierende Substanz. Im Plastikschauch befanden sich somit ausgehend von der Injektionskanüle nachfolgend die zu injizierende Substanz, die Luftblase und die Kochsalzlösung. Kochsalzlösung und Substanz konnten somit durch die abgrenzende Luftblase gut voneinander unterschieden werden, so dass nur die Substanz injiziert wurde und der Fortschritt der Injektion kontrolliert werden konnte. Bevor die gekühlten Lösungen in den Plastikschauch eingebracht wurden, wurden diese auf Raumtemperatur erwärmt, um die Bildung von Luftblasen im Schlauch zu vermeiden, die eine genaue Applikation verhindert hätten (Malpeli 1999). Innerhalb einer Minute wurde die Substanz kontinuierlich über eine Pumpe, die mit dem Ende des Plastikschauchs verbunden war und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  arbeitete, injiziert. Danach wurden die Injektionskanülen für eine weitere Minute in den Führungskanülen belassen, um ein Nachdiffundieren der Substanz zu ermöglichen (Wanisch & Wotjak 2008). Es wurde versucht, bilateral zu injizieren. Bei einigen Versuchstieren konnte dennoch nur eine unilaterale Injektion durchgeführt werden, da (nach einem Herausfallen der

Mandrins) Führungskanülen zum Teil durch getrocknetes Blut oder Einstreu aus den Käfigen verstopft waren. Für die Injektionsexperimente 2.3.3.1 *Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung* wurden lediglich die bilateral injizierten Versuchstiere in der Auswertung berücksichtigt, da aufgrund der relativ kurzen Wirkdauer des Lidocain nicht zu erwarten ist, dass die Substanz nach Diffusion in den kontralateralen Hippocampus dort noch eine Wirkung hat. Anders verhält es sich bei den Injektionsexperimenten mit Anisomycin (2.3.3.2, 2.3.3.3, 2.3.3.4). Hier wurden auch die unilateral injizierten Versuchstiere in der Auswertung berücksichtigt, da davon auszugehen ist, dass die Substanz in den kontralateralen Hippocampus diffundiert und aufgrund der relativ langen Wirkdauer des Anisomycins bilateral seine Wirkung entfaltet. (Wanisch & Wotjak 2008).



**Abb. 2: Isoflurannarkose:** Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran narkotisiert. Das Narkosegas wurde über eine Atemmaske zugeleitet. Diese bestand aus einer aufgeschnittenen Plastikspritze, welche über die Schnauze des Versuchstieres geschoben wurde und über ein Ventil mit dem Gummischlauch verbunden war, durch den das Narkosegas strömte. In die implantierten Führungskanülen wurden die Injektionskanülen vorgeschoben. Diese waren mit einem Schlauchsystem verbunden, in dem sich die zu injizierende Substanz befand. Die Schläuche wurden an eine Pumpe angeschlossen, die mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit arbeitete.

## **2.2.5 Histologie / Mikroskopie**

Nach Abschluss der Experimente wurden die Versuchstiere zum Einschläfern einige Minuten in einen Behälter gesetzt, in den einige Tropfen Isofluran gegeben wurden. Sobald äußerlich keine Atemexkursionen mehr erkennbar waren, wurden die Versuchstiere mit Hilfe einer Schere dekapitiert. Anschließend wurden die Kopfhaut mit einer Schere sowie die Schädeldecke abpräpariert. Das Gehirn wurde vorsichtig unter Erhalt des *Bulbus olfactorius* sowie des Kleinhirns aus der Schädelbasis heraus präpariert. Das freipräparierte Gehirn wurde sofort auf Aluminiumfolie, welche sich auf Trockeneis befand, gelegt und circa eine halbe Stunde angefroren. Nach dieser Zeit wurden die Gehirne sorgfältig in der Aluminiumfolie eingepackt und in einem Gefrierschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Später folgte das Schneiden der Gehirne mit Hilfe eines Kryomikrotoms. Dieser wurde circa eine halbe Stunde vor dem Schneiden auf Temperatur gebracht, wobei die Objekttemperatur circa -14 °C und die Kammertemperatur circa -16 °C betrug. Es wurden Schnitte von 15 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgenommen. Hierauf wurden die Schnittpräparate mindestens eine Stunde bei Raumluft getrocknet und anschließend nach Nissl (*siehe Anhang 7.1.1 Chemikalien*) gefärbt. Die gefärbten Schnittpräparate wurden mit Depex beschichtet, bevor die Deckgläschen aufgelegt wurden und abschließend getrocknet.

## **2.3 Experimente**

### **2.3.1 Soziale Diskrimination vor und nach der Operation**

Die soziale Diskrimination wurde bei allen Versuchstieren vor und nach der Op getestet. Vor der Op wurden insgesamt 103 Versuchstiere getestet. Einzelne Versuchstiere, die auch nach der zweiten Testung J1 deutlich länger untersuchten als J2, wurden für die Injektionsexperimente nicht verwendet. Des Weiteren wurden auch solche Tiere, die ein ausgeprägtes aggressives Verhalten gegenüber dem Jungtier zeigten, von weiteren Experimenten ausgeschlossen. Die von den weiteren Versuchen ausgeschlossenen Tiere wurden jedoch weiterhin in den ursprünglichen Gruppenkäfigen belassen, um das soziale Gefüge der Tiere nicht zu stören sowie um zu vermeiden, dass einzelne Tiere dauerhaft isoliert gehalten werden müssen.

(Kogan et al. 2000). Von den 103 getesteten Versuchstieren standen anschließend noch 90 Versuchstiere für die Implantation der Führungskanülen zur Verfügung. Aufgrund von Tierverlusten entweder durch Operationskomplikationen, schwere Verletzungen infolge von Rivalenkämpfen unter den Gruppentieren oder auch aufgrund natürlichen Todes konnten letztlich 53 Tiere für weitere Versuche verwendet werden.

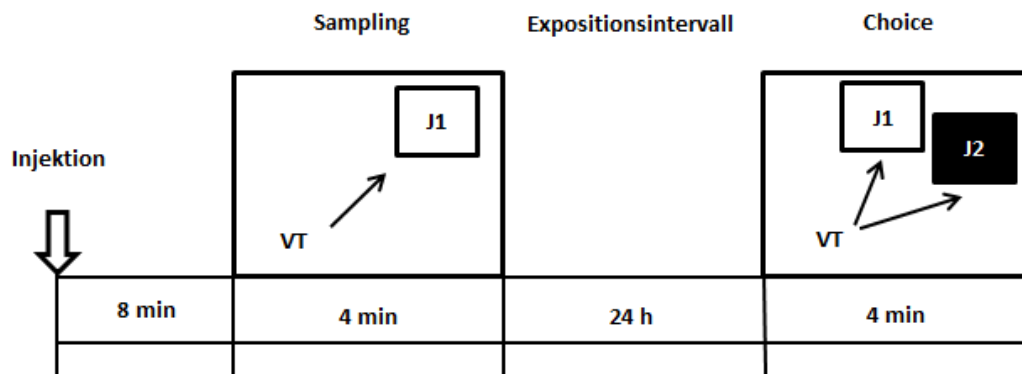
### **2.3.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase / Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der Versuchstiere**

Für eine Versuchstiergruppe bestehend aus 18 Tieren wurde die postoperative Phase hinsichtlich der Gewichtsentwicklung, der Untersuchungsdauer, des Aggressivitäts- und Sexualverhaltens sowie der Fähigkeit zur sozialen Diskrimination untersucht. Die ermittelten Messwerte an den sieben postoperativen Tagen wurden mit den Ausgangswerten vor der Op verglichen. Dabei wurden die Untersuchungsdauer sowie die Zeiten für Aggressivitäts- und Sexualverhalten an den postoperativen Tagen mit den Ausgangswerten während des *Samplings* aus 2.3.1. verglichen. Weiterhin wurden die Messwerte gegenüber männlichen und weiblichen Jungtieren getrennt voneinander betrachtet und miteinander verglichen.

### **2.3.3 Injektionsexperimente**

#### **2.3.3.1 Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung unmittelbar vor *Sampling***

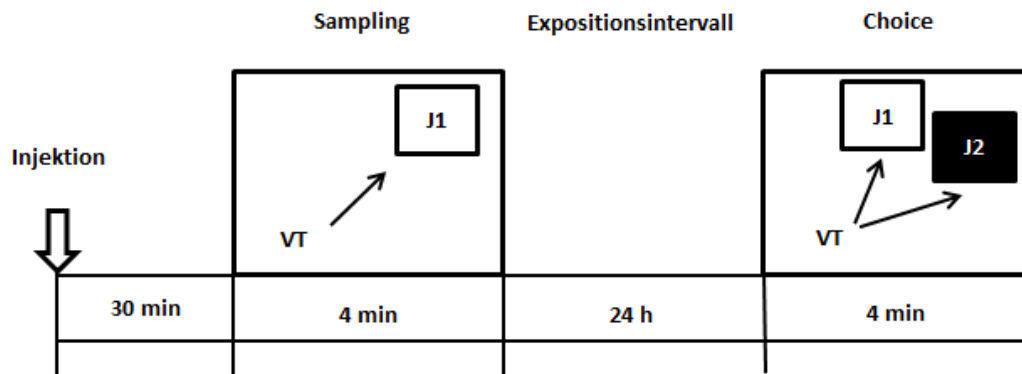
Wie in **Abbildung 3** dargestellt, erfolgte die Injektion der entsprechenden Substanz (Lidocain (20µg/µl) oder Kochsalzlösung) acht Minuten vor Beginn des *Samplings*. Die Injektion erfolgte mittels einer Pumpe kontinuierlich über eine Minute. Für eine weitere Minute wurden die Injektionskanülen in den Führungskanülen belassen. Die Versuchstiere wurden während dieser zwei Minuten mittels kontinuierlicher Isoflurangaszufuhr narkotisiert. Zwischen der zweiten und achten Minute wurden die Versuchstiere in ihre Versuchskäfige zurückgesetzt, so dass sie aus der Narkose erwachen konnten; ab der achten Minute erfolgte das *Sampling*.



**Abb. 3:** Schema zur Darstellung des Ablaufs der Injektion unmittelbar vor Sampling: Die Injektion der Substanz erfolgte acht Minuten vor dem Sampling. Danach erfolgte der Test auf soziale Diskrimination wie unter 2.2.1 beschrieben. VT: Versuchstier; J: Jungtier.

### 2.3.3.2 Injektion von Anisomycin versus Ringer-Lösung unmittelbar vor Sampling

Wie in **Abbildung 4** dargestellt, erfolgten die Injektionen von Anisomycin (40 µg/µl/Seite; vgl. Wanisch et al. 2008) bzw. Ringer-Lösung 30 Minuten vor dem Sampling und anschließend der Test auf soziale Diskrimination. Nach circa einer Woche wurden dieselben Tiere ohne Injektion auf ihr Wiedererkennungsvermögen getestet, um auszuschließen, dass es allein durch die Injektion zu einer irreversiblen Läsion des Hippocampus mit möglichen Verhaltenskonsequenzen gekommen ist. Nachdem alle Versuchstiere ein intaktes olfaktorisches Wiedererkennungsvermögen zeigten, wurden die restlichen Injektionen durchgeführt.



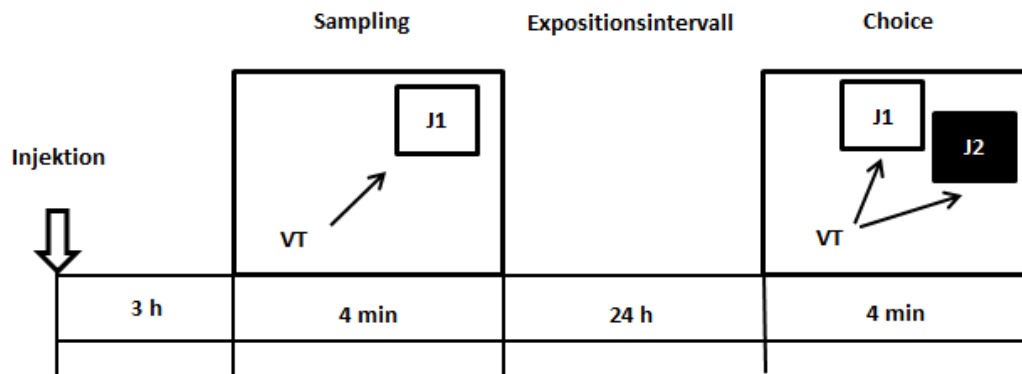
**Abb. 4:** Schema zur Darstellung des Ablaufs der Injektion 30 Minuten vor Sampling:

Die Injektion der Substanz erfolgte 30 Minuten vor dem Sampling. Danach erfolgte der Test auf soziale Diskrimination wie unter 2.2.1 beschrieben. VT: Versuchstier; J: Jungtier.

### 2.3.3.3 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung drei Stunden vor Sampling

Die Injektionen von Anisomycin oder NaCl-Lösung erfolgten, wie in **Abbildung 5** dargestellt, drei Stunden vor dem *Sampling*. Entsprechend den bisher beschriebenen Versuchen erfolgte die kontinuierliche Injektion über eine Pumpe innerhalb einer Minute, für eine weitere Minute wurden die Injektionskanülen in den Führungskanülen belassen. Während dieser zwei Minuten wurden die Versuchstiere mittels kontinuierlicher Isoflurangaszufuhr narkotisiert. Danach wurden die Versuchstiere zur Erholung in die Versuchskäfige gesetzt. Drei Stunden nach der Injektion erfolgten das *Sampling* sowie der Test zur sozialen Diskrimination. Die Versuchstiere wurden bei dieser Versuchsreihe in zwei Gruppen geteilt. Zunächst wurde Gruppe A mit Anisomycin injiziert bzw. Gruppe B mit NaCl-Lösung. Nach einer Woche wurde Gruppe A mit NaCl-Lösung injiziert bzw. Gruppe B mit Anisomycin.

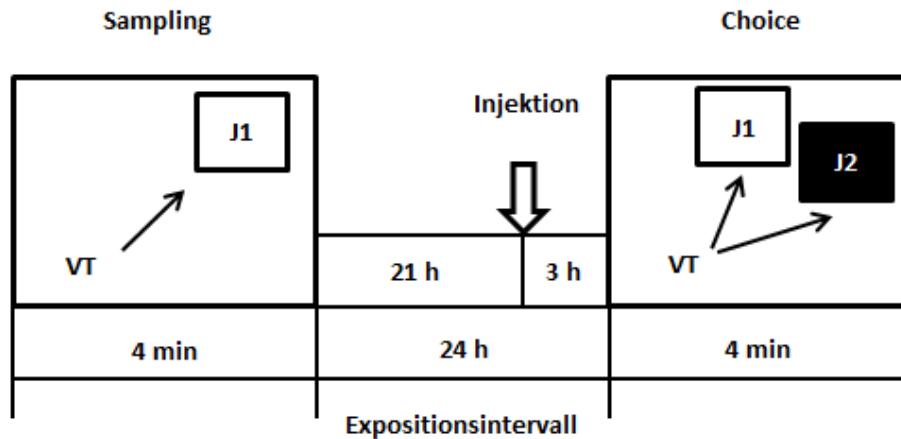




**Abb. 5:** Schema zur Darstellung der Injektion drei Stunden vor Sampling: Die Injektion erfolgte entsprechend der 3 h vor Sampling. Anschließend wurden die Tiere zur Erholung in die Versuchskäfige zurückgegeben. Drei Stunden nach der Injektion erfolgte die soziale Diskrimination wie unter 2.2.1 beschrieben. VT: Versuchstier; J: Jungtier.

#### 2.3.3.4 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung drei Stunden vor Choice

Wie in **Abbildung 6** dargestellt, erfolgte zunächst das *Sampling*. Nach einem Zeitintervall von 21 Stunden (21h) wurden die jeweiligen Injektionen mit Anisomycin oder NaCl-Lösung durchgeführt. Drei Stunden nach der Injektion, was einem Expositionsintervall von 24 Stunden nach *Sampling* entspricht, erfolgte das *Choice*.



**Abb. 6:** Schema zur Darstellung der Injektion drei Stunden vor Choice: Die Injektion der entsprechenden Substanz erfolgte 21 Stunden nach Sampling. Drei Stunden nach der Injektion erfolgte das Choice. VT: Versuchstier; J: Jungtier.

### 2.3.4 Statistische Analyse der Daten

Die Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms EVENTLOG gewonnen und die Dateien mit dem Computerprogramm WinRat geöffnet. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel® und mit dem Softwareprogramm GB-STAT. Dabei wurden Mittelwerte (MW) und Standardfehler der Mittelwerte (SFM) berechnet. Für die Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase hinsichtlich Körpermasse, Untersuchungsdauer sowie Dauer von Aggressivität und Sexualverhalten an sieben postoperativen Tagen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Um genauer analysieren zu können, welche Tage sich signifikant voneinander unterschieden, wurden Gruppenvergleiche mit Hilfe des Post-hoc-Tests nach Tukey/Kramer durchgeführt. Die statistische Analyse von Datenpaaren z.B. der Untersuchungsdauer, des Aggressivitäts- und Sexualverhaltens während des Choice erfolgte mit Hilfe des Student's T-Testes. Bei  $p < 0,05$  wurde ein signifikanter Unterschied der o.g. abhängigen Variablen an den postoperativen Tagen akzeptiert.

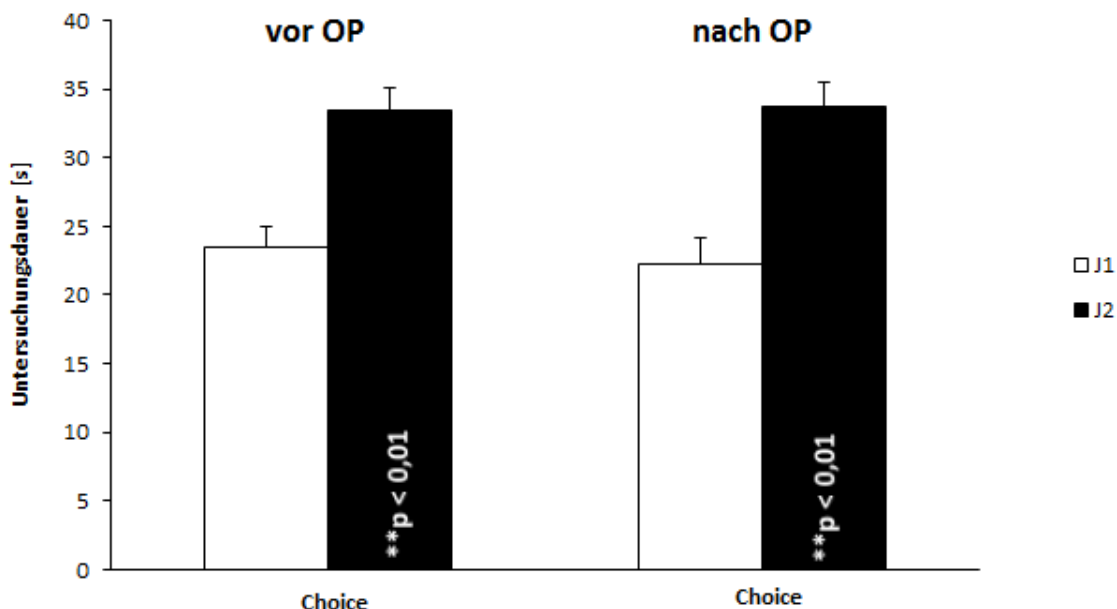
Falls nicht anders angegeben, sind alle Daten der vorliegenden Arbeit als MW + SFM dargestellt.

### 3 Ergebnisse

In der **Tabelle 7.2.1** im Anhang sind für alle Experimente die Untersuchungsdauer sowohl während des *Samplings* als auch während *Choice* aufgelistet. Aus ihr geht hervor, dass die Versuchstiere während des *Samplings* ausreichend Zeit aufgebracht haben, um das Jungtier zu untersuchen. Die Untersuchungsdauer während des *Samplings* lag in jedem Fall deutlich über der einzeln gemessenen Untersuchungsdauer von J1 und J2 während des *Choice*. Die folgenden Abbildungen zeigen die jeweils gemessene Untersuchungsdauer während *Choice*. Die entsprechenden Zeiten während des *Samplings* sind hier nicht dargestellt, da allein der Vergleich der Untersuchungsdauer zwischen J1 und J2 während *Choice* hinreichend ist, um eine Aussage zum olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnis treffen zu können.

#### 3.1 Soziale Diskrimination vor und nach der Operation

Es zeigte sich, dass die Versuchstiere sowohl vor als auch mindestens sieben Tage nach der Op J1 signifikant weniger lange untersuchten als J2 (siehe **Abb. 7**).



**Abb. 7:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice vor und nach Op: Eine intakte soziale Diskriminationsfähigkeit wurde sowohl vor als auch mindestens sieben Tage nach der Op gemessen. Die Untersuchungsdauer war in beiden Fällen für J1 signifikant geringer als für J2, t-Test ( $n(\text{vor Op}) = 103$ ,  $n(\text{nach Op}) = 69$ ).

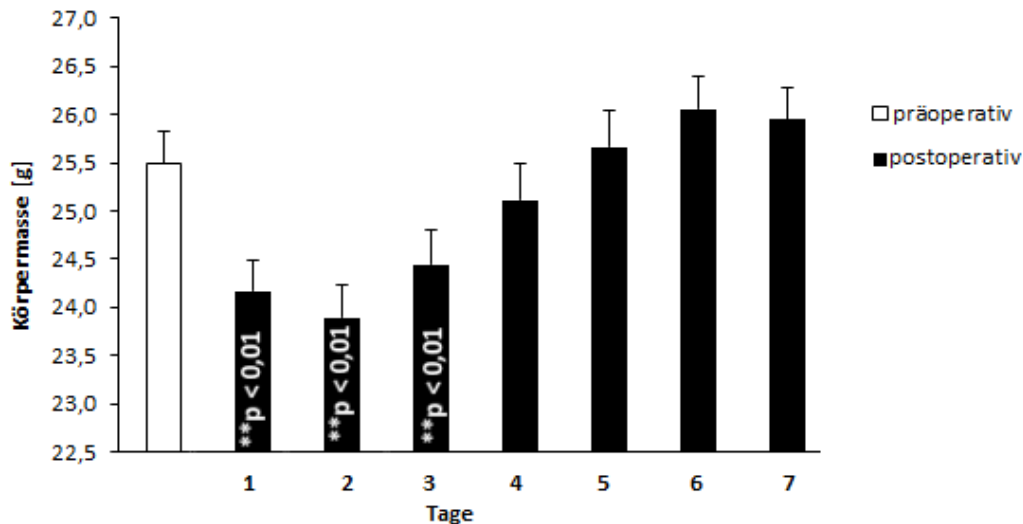
### 3.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase / Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf das Verhalten der Versuchstiere

Die Analyse der Daten mit Hilfe der ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt der Operation auf die Körpermasse ( $F(7;119) = 18,08$ ,  $p < 0,0001$ ). Um diesen Einfluss genauer zu spezifizieren und eine Aussage darüber treffen zu können, wie lange die Gewichtsreduktion postoperativ anhielt, wurde eine Post-hoc-Analyse mit Hilfe des Tukey-Kramer-Tests durchgeführt. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden in **Abbildung 8** nur die Vergleiche der Körpermassen, gemessen an den postoperativen Tagen, zur präoperativen Körpermasse dargestellt. Wie in **Abbildung 8** zu erkennen, konnte eine signifikante Abnahme der Körpermasse bis zum dritten Tag nach der Op festgestellt werden, wobei die Körpermasse bis zum zweiten postoperativen Tag um circa 1,5 g sank (6% der am Tag der Op gemessenen Ausgangsmasse). Ab dem dritten postoperativen Tag kam es wieder zu einem Anstieg der Körpermasse.

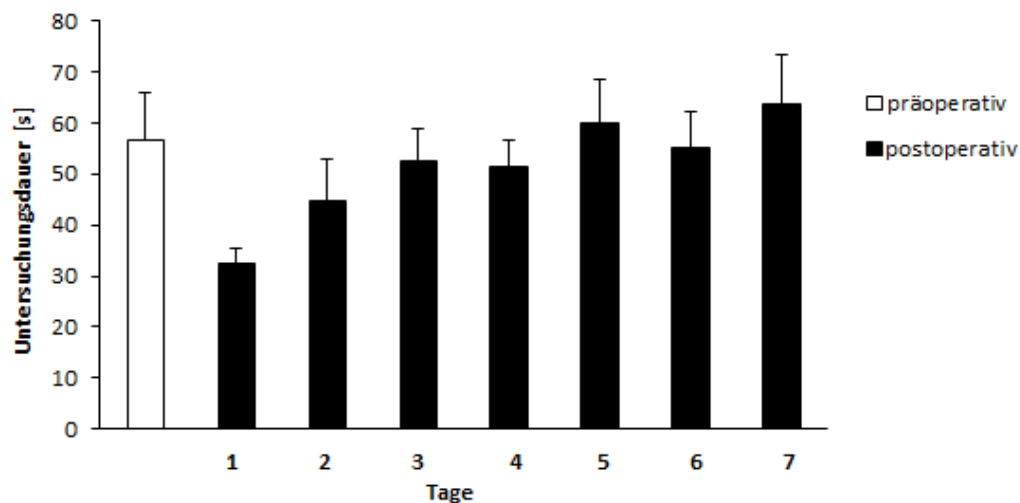
Hinsichtlich der postoperativen Untersuchungsdauer, welche in **Abbildung 9** dargestellt ist, ergab die Varianzanalyse zwar einen signifikanten Einfluss der Operation auf die postoperative Untersuchungsdauer ( $F(7;112) = 2,13$ ,  $p = 0,0465$ ), jedoch zeigte der Post-hoc-Test keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Hinsichtlich Aggressivität und Sexualverhalten, welche in **Abbildung 10** dargestellt ist, lieferte die ANOVA einen signifikanten Einfluss der Op. Die Post-hoc-Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen dem 6. postoperativen Tag und, bis auf Tag 3, allen übrigen Tagen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Ausgangswert vor der Op und den übrigen postoperativ gemessenen Werten zeigten sich nicht.

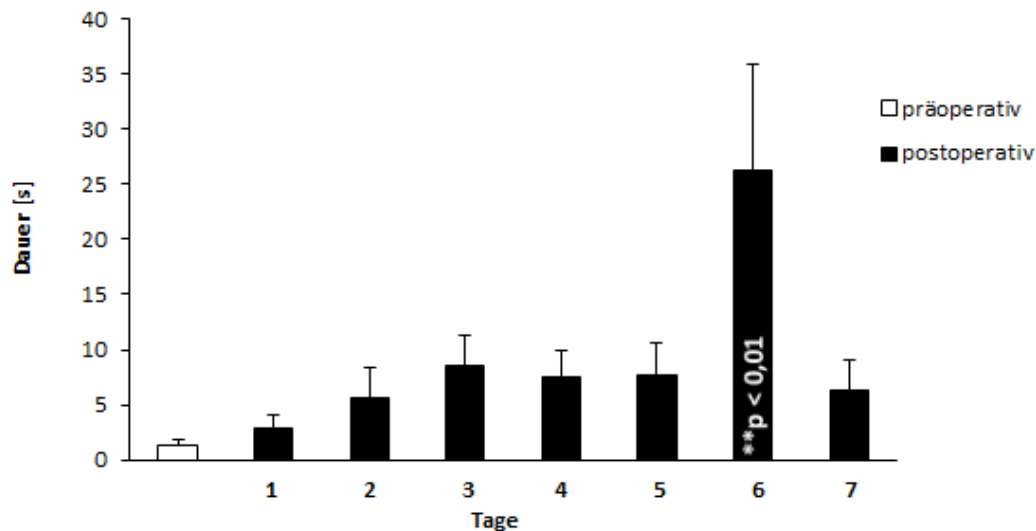
Die Untersuchungsdauer gegenüber weiblichen Jungtieren (weibl.JT) und männlichen Jungtieren (männl.JT) zeigte keinen signifikanten Unterschied (t-Test,  $p = 0,39$ ), wie in **Abbildung 11** zu erkennen ist. Ebenso konnte hinsichtlich des Aggressivitäts- bzw. Sexualverhaltens gegenüber den Jungtieren kein signifikanter Unterschied zwischen den Jungtiergeschlechtern festgestellt werden (t-Test,  $p = 1$ ).



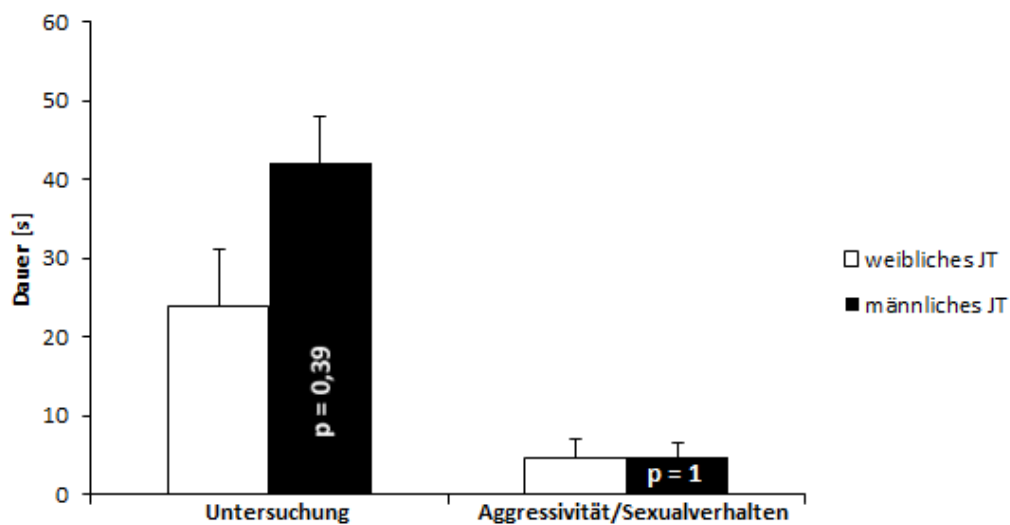
**Abb. 8:** Entwicklung der Körpermasse (MW + SFM) nach der Op: Präoperativ lag die Körpermasse bei durchschnittlich 25,5 g. Am ersten bis dritten postoperativen Tag war eine signifikante Abnahme der Körpermasse im Vergleich zur Ausgangsmasse zu verzeichnen; ANOVA:  $F(7;119) = 18,08$ ;  $p < 0,0001$  ( $n = 18$ ).



**Abb. 9:** Entwicklung der Untersuchungsdauer (MW + SFM) nach der Op: Während die Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss der Operation auf die postoperative Untersuchungsdauer zeigte ( $F(7;112) = 2,13$ ,  $p = 0,0465$ ), brachte der Post-hoc-Test keine signifikanten Gruppenunterschiede ( $n = 17$ ).



**Abb. 10:** Dauer (MW + SFM) von Aggressivität/Sexualverhalten: Das Aggressivitäts-/Sexualverhalten zeigte am 6. postoperativen Tag ein signifikant erhöhtes Niveau ( $F(7;112) = 4,78$  ( $n = 17$ )).

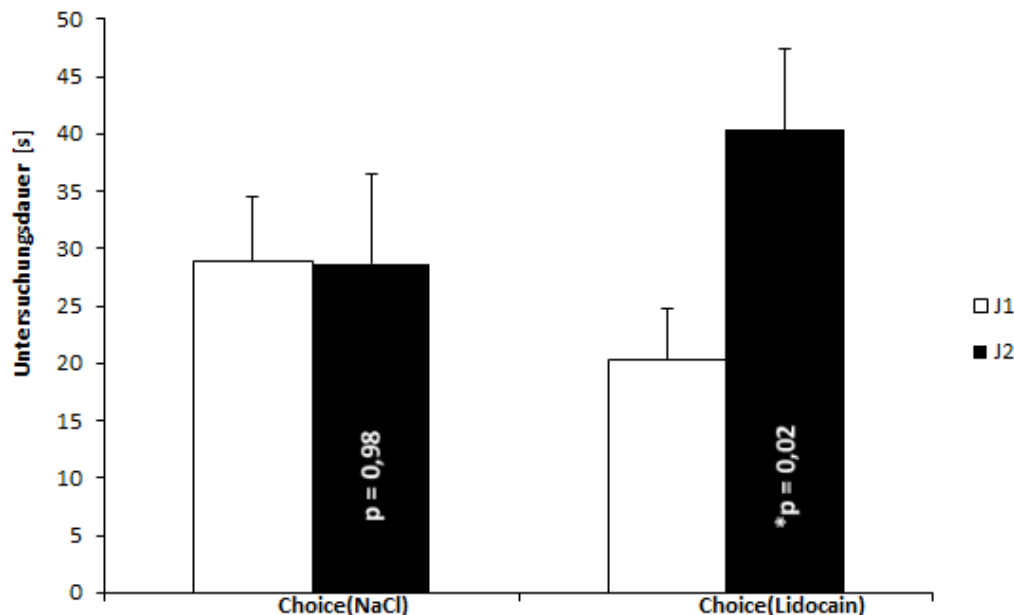


**Abb. 11:** Untersuchungsdauer und Dauer (MW + SFM) des Aggressivitäts-/Sexualverhaltens gegenüber Jungtieren getrennt für die beiden Geschlechter: Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Jungtiergeschlechtern hinsichtlich Untersuchungsdauer ( $n(\text{weibl.JT}) = 23$ ,  $n(\text{männl.JT}) = 23$ ) und Dauer des Aggressivitäts-/Sexualverhaltens ( $n(\text{weibl.JT}) = 18$ ,  $n(\text{männl.JT}) = 18$ ) festgestellt werden.

### 3.3 Injektionsexperimente

#### 3.3.1 Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung unmittelbar vor Sampling

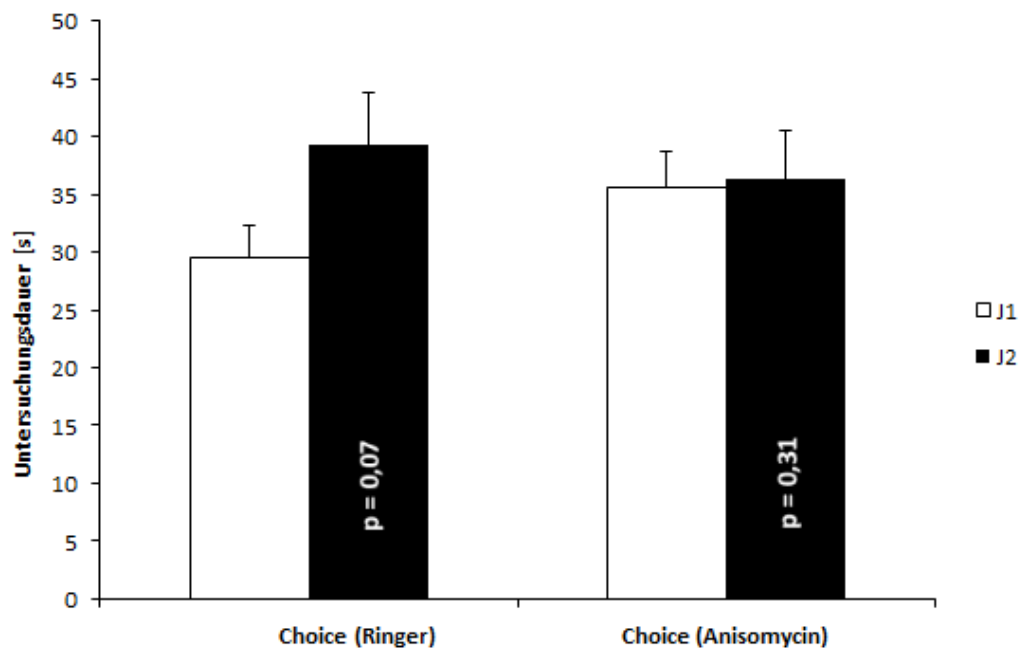
Nach der Injektion von NaCl-Lösung unmittelbar vor dem *Sampling* wies die Untersuchungsdauer während des *Choice* gegenüber J1 und J2 keinen signifikanten Unterschied auf (t-Test,  $p = 0,98$ ). Nach der Injektion von Lidocain-Lösung unmittelbar vor dem *Sampling* wurde J2 signifikant länger untersucht als J1 (t-Test,  $*p = 0,02$ ), (**Abb. 12**).



**Abb. 12:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice nach Injektion von NaCl- vs. Lidocain-Lösung in den dorsalen Hippocampus unmittelbar vor Sampling: Nach der Injektion von NaCl zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer von J1 und J2 ( $n=9$ ). Nach der Injektion von Lidocain wurde J2 signifikant länger untersucht als J1 ( $n = 10$ ).

### 3.3.2 Injektion von Anisomycin versus Ringer-Lösung unmittelbar vor *Sampling*

Nach der Injektion von Ringer-Lösung unmittelbar vor dem *Sampling* konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer während des *Choice* festgestellt werden (t-Test,  $p = 0,07$ ). Nach der Injektion von Anisomycin kurz vor dem *Sampling* konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer gegenüber den Jungtieren festgestellt werden (t-Test,  $p = 0,31$ , **Abb. 13**).

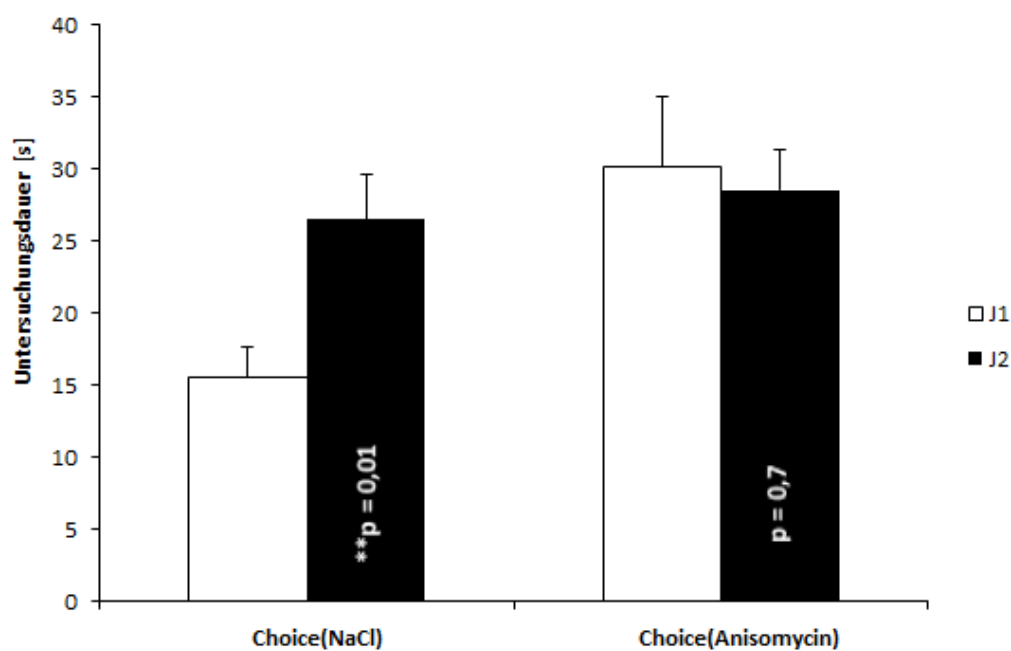


**Abb. 13:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice nach Injektion von Ringer- vs. Anisomycin-Lösung in den dorsalen Hippocampus unmittelbar vor Sampling: Weder nach Injektion von Ringer-Lösung ( $n = 8$ ) noch nach Injektion von Anisomycin ( $n = 14$ ) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Untersuchungsdauer gegenüber J1 und J2.



### 3.3.3 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung drei Stunden vor *Sampling*

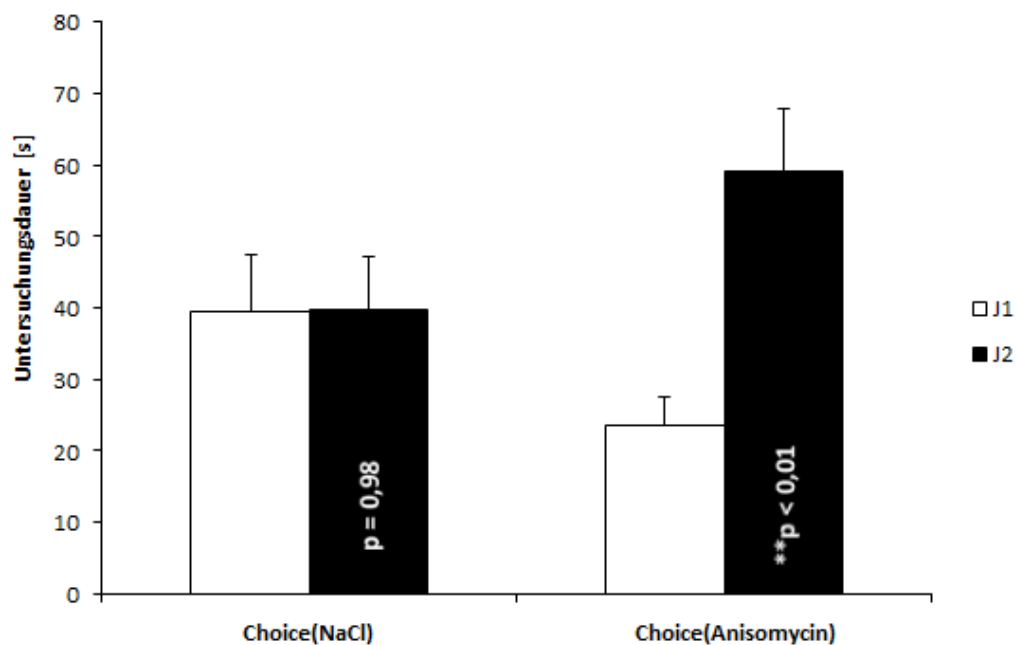
Nach der Injektion von Anisomycin drei Stunden vor dem *Sampling* konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer gegenüber den Jungtieren beim *Choice* festgestellt werden (t-Test,  $p = 0,7$ ). Nach Injektion der NaCl-Lösung drei Stunden vor dem *Sampling* wurde J2 im *Choice* signifikant länger untersucht als J1 (t-Test,  $**p = 0,01$ , **Abb. 14**).



**Abb. 14:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice nach Injektion von NaCl- vs. Anisomycin-Lösung in den dorsalen Hippocampus drei Stunden vor Sampling: Nach Injektion von NaCl wurde J2 signifikant länger untersucht als J1 ( $n = 11$ ); nach Injektion von Anisomycin zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Untersuchungsdauer zwischen J1 und J2 ( $n = 11$ ).

### 3.3.4 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung drei Stunden vor *Choice*

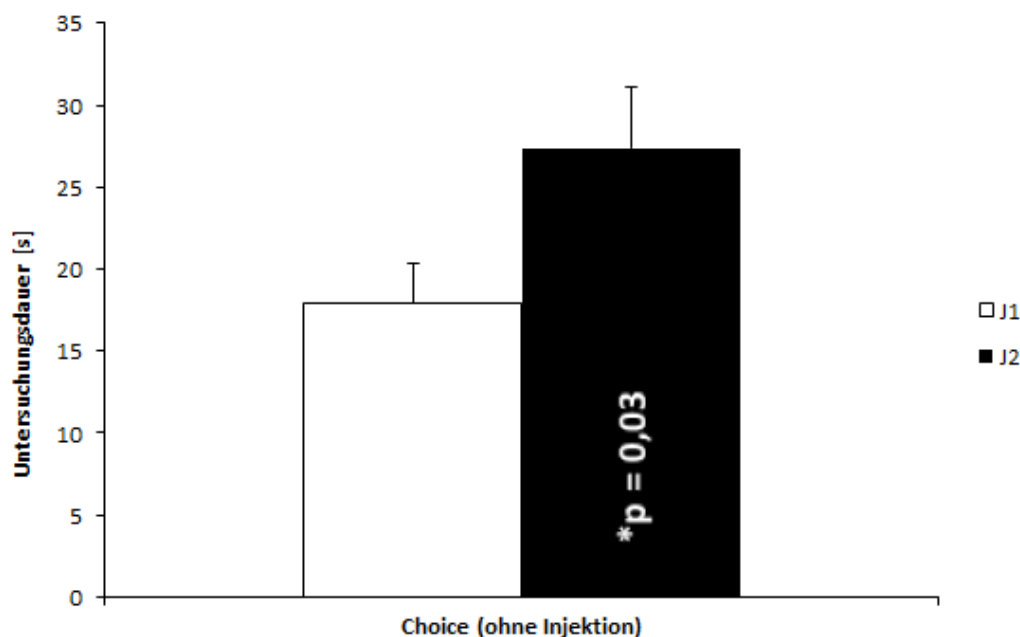
Nach der Injektion von Anisomycin drei Stunden vor dem *Choice* wurde J2 signifikant länger untersucht als J1 (t-Test,  $**p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Injektion von NaCl kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer zwischen J1 und J2 (t-Test,  $p = 0,98$ , **Abb. 15**).



**Abb. 15:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice nach Injektion von NaCl- vs. Anisomycin-Lösung in den dorsalen Hippocampus drei Stunden vor Choice: Nach der Injektion von NaCl zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Untersuchungsdauer von J1 und J2 ( $n = 6$ ); nach der Injektion von Anisomycin wurde J2 signifikant länger untersucht als J1 ( $n = 7$ ).

### 3.3.5 Überprüfung der Fähigkeit zur sozialen Diskrimination nach mindestens einer Injektion

Eine Woche nach der Injektion von Anisomycin oder NaCl-Lösung ergab die Messung der sozialen Diskrimination ohne Injektion einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Untersuchungsdauer gegenüber den Jungtieren (t-Test,  $p = 0,03$ ): J2 wurde signifikant länger untersucht als J1, (**Abb. 16**).

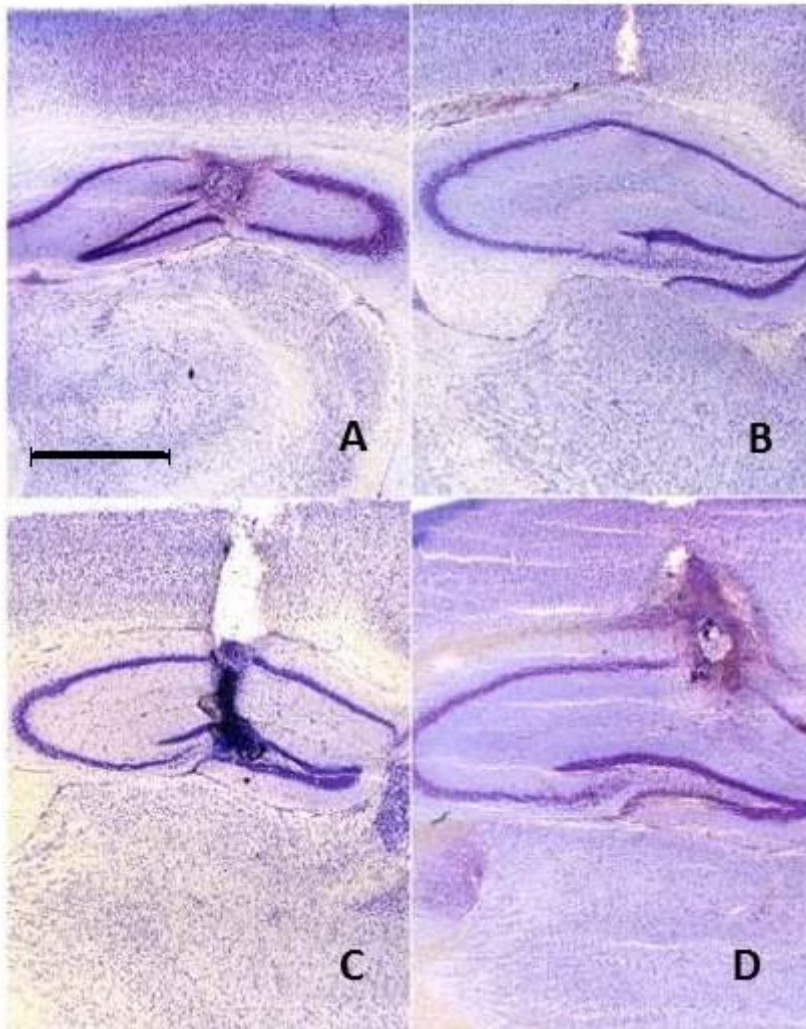


**Abb. 16:** Untersuchungsdauer (MW + SFM) im Choice nach mindestens einer Injektion: Eine Woche nach der Anisomycin-/NaCl-Injektion zeigten die Versuchstiere eine intakte Fähigkeit zur sozialen Diskrimination ( $n=14$ ).

## 3.4 Histologie

Die gefärbten Hirnschnitte wurden im Lichtmikroskop betrachtet und die Lokalisation des Stichkanals aufgesucht. Dieser konnte entweder als länglicher Gewebdefekt oder in Form von Granulationsgewebe im Bereich der hippocampalen Formation erkannt werden. Der Stichkanal befand sich in allen Fällen auf Höhe des dorsalen Hippocampus und endete entweder kurz oberhalb der CA1-Region oder zwischen CA1 und *Gyrus dentatus*. Die **Abbildungen 17 A-D** zeigen repräsentative Beispiele

für derartige, als korrekte Lokalisation der Injektion interpretierte, Positionen der Stichkanäle im gefärbten Hippocampuschnitt.



**Abb. 17:** Repräsentative Mikrophotographien von nach Nissl gefärbter Schnittpräparate verschiedener Versuchstiere im Bereich des dorsalen Hippocampus nach den Injektionsexperimenten: A: linker Hippocampus: Der Stichkanal ist als Granulationsgewebe zwischen CA1 und dem Gyrus dentatus zu erkennen; B: rechter Hippocampus: Der Stichkanal ist als Gewebssaussparung oberhalb der CA1-Region zu erkennen; C: rechter Hippocampus: Der Stichkanal ist oberhalb der CA1-Region als Gewebssaussparung sowie zwischen CA1 und Gyrus dentatus als Granulationsgewebe zu erkennen; D: rechter Hippocampus: Der Stichkanal ist als Granulationsgewebe auf Höhe der CA1-Region zu erkennen; Maßstab für alle Photographien in A: 1 mm.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des dorsalen Hippocampus für die olfaktorische Gedächtnisbildung bei der Maus zu untersuchen. Dabei interessierte zum einen, ob dieser Anteil des Hippocampus überhaupt essentiell an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligt ist; zum anderen, wenn er beteiligt sein sollte, zu welchen Zeitpunkten der Gedächtnisbildung (Akquisition und/oder Konsolidierung und/oder Abrufen) dieser eine Rolle spielt. Weiterhin galt es, zwischen verschiedenen möglichen (neuronalen) Mechanismen zu differenzieren. Deshalb wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der olfaktorischen Gedächtnisbildung Substanzen direkt in den dorsalen Hippocampus appliziert, die entweder als Natriumkanalblocker wirken (Lidocain) oder aber die lokale Proteinbiosynthese inhibieren (Anisomycin).

Lidocain sollte dabei die Informationsweiterleitung in den Neuronen unterbrechen, während Anisomycin die lokale Informationsverarbeitung durch *De-novo*-Proteinbiosynthese blockieren sollte.

Es wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem zum einen durch die permanente Implantation von Führungskanülen und zum anderen durch die reversible Hippocampusläsion durch die entsprechenden Substanzen die einzelnen Versuchstiere für mehrere Versuche verwendet werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere für mindestens eine und maximal vier Injektionen verwendet.

Ein weiterer Vorteil dieser Versuchsanordnung war, dass der natürliche Trieb ausgewachsener Mäuse, unbekannte Artgenossen zu untersuchen, ausgenutzt wurde. Somit konnte auf die Verabreichung zusätzlicher Stimuli, wie z.B. eines Fußschocks, verzichtet werden (Engelmann 2008).

Jedes Versuchstier wurde noch vor der Implantation der Führungskanülen auf seine intakte Fähigkeit zur sozialen Diskrimination getestet. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass das Versuchstier nach 24 Stunden das bekannte Jungtier (J1) weniger lange untersucht als das unbekannte Jungtier (J2) (Engelmann et al. 1995).

Aus der **Tabelle 7.2.1** geht hervor, dass die Versuchstiere während des *Samplings* ausreichend Zeit aufgebracht haben, um das Jungtier zu untersuchen. Die Untersuchungsdauer während des *Samplings* lag in jedem Fall deutlich über der einzeln gemessenen Untersuchungsdauer von J1 und J2 während des *Choice*.

Die **Abbildung 7** zeigt, dass die Versuchstiere sowohl vor als auch nach der Op J1 signifikant kürzer untersuchten als J2. Somit konnte man davon ausgehen, dass die vor der Op vorhandene Fähigkeit der Versuchstiere zur olfaktorischen Wiedererkennung eines Artgenossen durch die Op nicht beeinträchtigt wurde.

Eine Versuchstiergruppe bestehend aus 17-18 Versuchstieren wurde an sieben postoperativen Tagen täglich hinsichtlich Körpergewicht, Untersuchungsdauer und Aggressivitäts- bzw. Sexualverhalten untersucht. Es wurde festgestellt, dass bis zum dritten postoperativen Tag eine signifikante Reduktion der Körpermasse messbar war (**Abb. 8**). Dies ist vermutlich auf die reduzierte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme bei allgemeinem Antriebsmangel sowie auf die durch die Op ausgelöste allgemeine „Stressreaktion“ des Körpers zurückzuführen. Ab dem vierten postoperativen Tag erreichten – statistisch betrachtet – die Versuchstiere wieder die Körpermasse vor der Op. Folglich ist bei der hier durchgeführten Operationsmethode bis zum dritten postoperativen Tag mit einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts und damit womöglich Schwächung der körperlichen Konstitution der Versuchstiere zu rechnen, so dass eine postoperative Erholungszeit, in der keine Versuche durchgeführt werden, von mindestens 3 Tagen, sinnvoll ist. Für die hier durchgeführten Versuche wurde eine postoperative Erholungszeit von 7 Tagen eingehalten.

Hinsichtlich der Untersuchungsdauer unterschieden sich die gewonnenen Daten vor und nach der Op zwar in der ANOVA signifikant, jedoch nicht im Post-hoc-Test (**Abb. 9**). Dieses Ergebnis war für die Planung der Injektionsexperimente von Bedeutung und sollte für zukünftige Studien berücksichtigt werden. Da es postoperativ zu keiner signifikanten Reduktion der Untersuchungsdauer kam, scheint die Motivation und Fähigkeit, Artgenossen zu untersuchen, nur wenig unter dem Eingriff gelitten zu haben. Die diesbezüglich gelegentlich beschriebene Erholungsphase über mehr als eine Woche postoperativ (Kogan et al. 2000, Daumas et al. 2005, Canal et al. 2007), ist somit beim hier beschriebenen Procedere nicht notwendig. Trotzdem erscheint – schon auf Grund der oben diskutierten Abnahme des Körpergewichtes nach der Op – eine postoperative Erholungsphase von wenigstens drei Tagen empfehlenswert. Über die Gründe, warum in der vorliegenden Studie nach der Op eine vergleichsweise rasche „Normalisierung“ der kritischen Verhaltensparameter (soziale Investigation) eintrat, kann nur spekuliert werden, da für einen genauen Vergleich eine detaillierte Analyse der Op-Prozedur mit den anderen Laboratorien notwendig wäre. Möglicherweise spielen eben diese Verhaltensparameter im konkreten

Verhaltenstest eine wesentliche Rolle. Die soziale Diskrimination ist weder physisch erschöpfend (anders als das Morris water maze (Engelmann et al. 2006)), noch stellt sie eine hohe emotionale Belastung für die Versuchstiere dar (anders als die Furchtkonditionierung (Kamprath & Wotjak 2004)). Möglicherweise hat aber auch die Verwendung der die Heilung unterstützenden Medikamente (Metacam und Refobacin) zur raschen Erholung der Versuchstiere beigetragen. Das näher zu untersuchen, hätte aber den Rahmen der vorliegenden Dissertation gesprengt.

Weiterhin wurden die Dauer von aggressivem und Sexualverhalten an den postoperativen Tagen mit der Dauer vor Op verglichen (**Abb. 10**). Bis auf den sechsten postoperativen Tag, an dem die Dauer von Aggressivität bzw. Sexualverhalten signifikant über dem Wert vor Op lag, waren an den übrigen postoperativen Tagen keine Unterschiede zum Ausgangswert nachweisbar. Die Ursachen für das hohe Niveau am sechsten postoperativen Tag sind völlig unklar. Wenn wir am sechsten postoperativen Tag von einem unsystematischen Fehler ausgehen, ist aus den erhobenen Daten zu entnehmen, dass die Op keinen Einfluss auf die Dauer von Aggressivität und Sexualverhalten postoperativ hatte. Andererseits sollte in folgenden Studien auf eine möglicherweise wiederholt auftretende verstärkte Aggressivität der Versuchstiere am sechsten postoperativen Tag geachtet werden, um einen systematischen Op-Effekt sicher ausschließen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl hinsichtlich der Untersuchungsdauer als auch hinsichtlich des Aggressivitäts- bzw. Sexualverhaltens keinen signifikanten Unterschied aufgrund des Jungtiergeschlechtes gab (**Abb. 11**) und bestätigt, dass Jungtiere beiderlei Geschlechts für die soziale Diskrimination eingesetzt werden können (Hädicke 2013). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem von Thor und Holloway (1982) veröffentlichtem Ergebnis, wonach von adulten, männlichen Ratten untersuchte männliche Jungtiere signifikant länger untersucht wurden als weibliche Jungtiere. Es kann vermutet werden, dass insbesondere das experimentelle Procedere der sozialen Diskrimination das Problem einer Jungtiergeschlechtsspezifischen Erhöhung oder Erniedrigung der Untersuchungszeiten in den Hintergrund schiebt (vgl. auch Hädicke 2013).

Nach Implantation der Führungskanülen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der olfaktorischen Gedächtnisbildung die Substanzen Lidocain oder Anisomycin bzw. die Kontrollsubstanzen NaCl- oder Ringerlösung lokal und (falls nicht anders angegeben auch) bilateral in die dorsalen Hippocampi injiziert und die Fähigkeit zur

sozialen Diskrimination getestet. Bei einigen Versuchstieren konnte aufgrund verstopfter Führungskanülen nur unilateral injiziert werden. Im Falle der Lidocain-Injektionen wurden diese Versuchstiere in der Auswertung nicht mit berücksichtigt, da nach Diffusion in den kontralateralen Hippocampus aufgrund der geringen Halbwertszeit des Lidocain nicht mit einer bilateralen Wirkung von Lidocain zu rechnen ist. Bei den mit Anisomycin injizierten Versuchstieren ist davon auszugehen, dass nach unilateraler Injektion die Substanz auch in den kontralateralen Hippocampus diffundiert und aufgrund der etwa dreistündigen Wirkdauer des Anisomycins mit einer bilateralen Wirkung zu rechnen ist (Wanisch & Wotjak 2008). In **Abbildung 12** ist zu erkennen, dass trotz der Injektion von Lidocain unmittelbar vor dem *Sampling* die Fähigkeit zur sozialen Diskrimination nicht gestört wurde: J1 wurde signifikant weniger lange untersucht als J2. Dies impliziert, dass entweder der dorsale Hippocampus zu diesem Zeitpunkt an der olfaktorischen Gedächtnisbildung nicht beteiligt ist oder aber dass, wenn der dorsale Hippocampus an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligt sein sollte, dessen Funktion allein durch die Natriumkanalblockade durch Lidocain nicht gestört wird. Nach der Injektion von NaCl-Lösung, die eigentlich als Kontrollsubstanz dienen sollte, erkannten die Versuchstiere J1 nach 24 Stunden nicht wieder. Dieses Phänomen, das auch in darauf folgenden Versuchen und ebenso mit Ringer-Lösung auftrat (siehe **Abb. 13 und 15**), wurde von Noack (2012) ausführlich analysiert und diskutiert. Noack (2012) untersuchte das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen, jedoch nach temporärer Läsion der NAME. Ihre Ergebnisse zeigten, dass nach lokaler Applikation von Lidocain in den NAME unmittelbar vor dem *Sampling* die Fähigkeit das bekannte Jungtier wiederzuerkennen weiterhin vorhanden war, nach lokaler Applikation von NaCl-Lösung diese Fähigkeit jedoch gestört wurde. Die Autorin interpretierte diese Beobachtung dahingehend, dass durch die verabreichte NaCl-Lösung das lokale extrazelluläre Ionenmilieu so gestört wurde, dass eine normale Informationsverarbeitung nicht mehr stattfinden konnte. Zudem geht Noack (2012) davon aus, dass durch die NaCl-Lösung die Weiterleitung von Aktionspotentialen durch die Veränderung des extrazellulären Ionenmilieus gehemmt wurde und somit andere, mit den NAME unmittelbar kommunizierende und möglicherweise an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligte Hirnstrukturen, in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden. Somit könnten hier, auch wenn der dorsale Hippocampus nicht direkt an der Weiterleitung der olfaktorischen Information beteiligt sein sollte,



durch NaCl-Lösung aufgrund des komplexen neuronalen Verbundes andere, essentielle Hirnstrukturen beeinflusst worden sein, was letztlich zu einer Störung des olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses führte. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Störung des lokalen Ionenmilieus auch dazu führte, dass Teile des dorsalen Hippocampus aktiviert wurden und so zu der Verhaltensantwort beitrugen, ohne ursächlich in die gedächtnisrelevante Informationsverarbeitung im engeren Sinne einbezogen zu sein. So wäre auch erklärlich, warum nach Applikation von (in NaCl-Lösung gelöstem) Lidocain in den dorsalen Hippocampus der Versuchstiere das bekannte Jungtier wiedererkannten. Möglicherweise unterdrückte Lidocain nicht nur die excitatorische Wirkung der NaCl-Lösung, sondern letztlich auch die Informationsweiterleitung im dorsalen Hippocampus (vgl. Noack 2012, für ähnliche Beobachtungen in der medialen Amygdala). Auch wenn dieser Effekt nicht erwartet wurde und die NaCl-Lösung somit für diese Versuche keine wirkungsneutrale Kontrollsubstanz darstellt, so implizieren diese Ergebnisse, dass der dorsale Hippocampus zum Zeitpunkt des *Samplings* nicht zwingend an der olfaktorischen Gedächtnisbildung beteiligt ist. Zumindest scheint die Hemmung der Informationsweiterleitung im dorsalen Hippocampus keinen Einfluss auf die olfaktorische Langzeit-Gedächtnisbildung zu haben. Jedoch führt die Beeinflussung der Bildung von Aktionspotentialen am Injektionsort durch NaCl-Lösung zu einer gestörten olfaktorischen Gedächtnisbildung, vermutlich durch neuronale Verbindungen des dorsalen Hippocampus mit anderen Gedächtnis-relevanten Hirnstrukturen.

Nach der Injektion von Anisomycin unmittelbar vor dem *Sampling* (**Abb. 13**) zeigten die Versuchstiere nach 24 Stunden kein Wiedererkennen. Somit ist davon auszugehen, dass nach dem *Sampling* im dorsalen Hippocampus Proteinbiosyntheseprozesse ablaufen, die an der Bildung des olfaktorischen Gedächtnisses beteiligt sind. Bemerkenswert ist, dass in dieser Versuchsreihe anstatt NaCl- Ringer-Lösung als Kontrollsubstanz verwendet wurde. Aber auch die Injektion von Ringer-Lösung führte zum gleichen Phänomen wie die Gabe von NaCl-Lösung: Durch die Injektion der Kontrolllösung unmittelbar vor dem *Sampling* in den dorsalen Hippocampus kam es zu einer Störung des Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses. Offensichtlich stellte auch die Ringer-Lösung keine wirkungsneutrale Kontrollsubstanz dar, wobei die dadurch hervorgerufenen Effekte vermutlich sinngleich den oben für NaCl-Lösung beschriebenen sind.

Nach der Injektion von Anisomycin drei Stunden vor dem *Sampling* haben die Versuchstiere J1 nach 24 Stunden nicht wiedererkannt (**Abb. 14**). Dieses Zeitfenster wurde gewählt, um dem störenden Effekt von NaCl-Lösung zum Zeitpunkt des *Samplings* zu entgehen, so dass nur noch Anisomycin, welches – nach systemischer Applikation – auch drei Stunden nach der Injektion einen Verhaltenseffekt induziert (Wanisch et al. 2008), wirken kann. Tatsächlich war für die NaCl-Injektion drei Stunden vor dem *Sampling* kein störender Effekt auf das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis nachweisbar: Die Versuchstiere untersuchten J1 signifikant weniger lang als J2. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen war hier die Zeitspanne zwischen Injektion und *Sampling* offensichtlich lang genug, um ein Abklingen der bei unmittelbar vor dem *Sampling* stattgefundenen Injektion störenden Wirkung der NaCl-Lösung zum Zeitpunkt des *Samplings* zu bewirken. Legt man die Wirkdauer von in den dorsalen Hippocampus verabreichten Anisomycin zugrunde ( $< 9$  h, Wanisch & Wotjak 2008), ist davon auszugehen, dass die Verarbeitung der olfaktorischen Information im dorsalen Hippocampus während des *Samplings* und nach dem *Sampling* durch Anisomycin blockiert wurde. Dass die Versuchstiere nach 24 Stunden nicht mehr in der Lage waren J1 wiederzuerkennen, lässt vermuten, dass die *Sampling*-induzierte *De-novo*-Proteinsynthese im dorsalen Hippocampus an der Konsolidierung eines sozialen Langzeit-Gedächtnisses beteiligt ist.

In der **Abbildung 15** ist zu erkennen, dass die Anisomycin-Injektion drei Stunden vor dem *Choice* zu keiner Störung der olfaktorischen Gedächtnisbildung führte. Offensichtlich ist eine *De-novo*-Proteinsynthese im dorsalen Hippocampus für das olfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis zum Zeitpunkt der Informationsaufnahme und/oder Konsolidierung, nicht aber für das Abrufen eines konsolidierten Gedächtnisinhaltes kritisch. Interessanterweise wird durch NaCl-Injektion drei Stunden vor dem *Choice* jedoch das Abrufen der olfaktorischen Information gestört, die Untersuchungsdauer beider Jungtiere zeigte keinen signifikanten Unterschied. Dieser Befund ist derzeit nicht einfach zu erklären. Wie oben diskutiert, hatte eine NaCl-Injektion drei Stunden vor dem *Sampling* keinerlei hemmenden Einfluss auf das Wiedererkennungsgedächtnis. Insofern sollten auch zum Zeitpunkt des *Choice* mögliche NaCl-injektionsbedingte Störungen des extrazellulären Milieus im dorsalen Hippocampus zum Zeitpunkt des *Choice* abgeklungen sein. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, z.B. mit größeren Tiergruppengrößen mögliche

stochastische Effekte auszuschließen. Derzeitig lässt sich nur konstatieren, dass die Proteinbiosynthese zum Zeitpunkt des *Choice* keine Rolle mehr zu spielen scheint. Das deckt sich auch mit den Befunden nach systemischer Anisomycin-Injektion (Richter et al. 2005, Wansich et al. 2008).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Tierzahlen in den mit NaCl, Ringer, Lidocain und Anisomycin behandelten Gruppen in Anbetracht der Empfehlung von  $n = 20$  für die soziale Diskrimination bei Mäusen (Engelmann et al. 2011) vergleichsweise niedrig sind ( $n = 6-14$ ). Insofern kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass bei weiterführenden Untersuchungen abweichende Befunde gewonnen werden können. Jedoch war im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der Stichprobenumfänge weder technisch (Auslastung der Versuchsräume) noch zeitlich möglich. Zumindest aber wurden mit der vorliegenden Arbeit die experimentellen Grundlagen geschaffen, Ausfälle während des chirurgischen Eingriffs und durch Komplikationen *post implantationem* weiter zu minimieren und damit eine solide Grundlage für folgende Studien zu schaffen. Zudem erscheint endgültig (vgl. auch Noack 2012) der Einsatz von sowohl NaCl- und als auch Ringer-Lösung zur Lösung von Lidocain und/oder Anisomycin für intrazerebrale Injektionen im Zusammenhang mit der sozialen Diskrimination bei Mäusen obsolet. Unabhängig davon sind aber eine Reihe von hier mitgeteilten Beobachtungen bedeutsam und sollen deshalb nachfolgend kritisch diskutiert werden.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eine (wiederholte) Injektion von definierten Substanzen möglicherweise zu einer irreversiblen Störung der verhaltensrelevanten Informationsverarbeitung im dorsalen Hippocampus führt. Das wurde wenigstens 48 Stunden nach vorhergegangener Injektion getestet, wobei die Versuchstiere gänzlich unbehandelt blieben. In **Abbildung 16** ist das *Choice* ohne jede Injektion dargestellt, nachdem die Versuchstiere schon mindestens einmal mit einer Substanz behandelt wurden. Da hier J1 signifikant weniger lange untersucht wurde als J2, kann von einem intakten olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnis bei den Versuchstieren trotz vorheriger Injektion ausgegangen werden. Das spricht für die Tauglichkeit der lokalen Injektionen in den dorsalen Hippocampus, akute Behandlungseffekte zu induzieren, die offensichtlich relativ schnell abklingen und nicht zu einer andauernden Leistungsbeeinträchtigung führen.

In der derzeit vorliegenden Literatur zum olfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnis gibt es unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der

möglichen Beteiligung des Hippocampus häufig ohne, dass zwischen dorsalem und ventralem Anteil oder gar zwischen noch feineren Strukturen (CA1 *versus* Gyrus dentatus etc.) unterschieden wird. In der Arbeit von Kogan et al. (2000) wurde publiziert, dass die olfaktorische Langzeit-Gedächtnisbildung bei Mäusen wesentlich vom intakten Hippocampus *in toto* abhängig ist und auf Proteinbiosynthese beruht, das Kurzzeitgedächtnis jedoch auch in Hippocampus-lädierten Tieren funktioniert (Kogan et al. 2000). Hippocampusläsionen wurden von der Arbeitsgruppe um Kogan (2000) irreversibel mittels lokaler, bilateraler Injektion von Ibotensäure in die gesamte Hippocampusformation (einschließlich des ventralen Anteils) hervorgerufen. Die Versuchstiere, die eine permanente Hippocampusläsion erlitten, zeigten 30 Minuten nach der Jungtierexposition eine fehlende Fähigkeit zur sozialen Wiedererkennung und somit kein olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis. Dieser Befund erscheint überraschend, denn Studien mit Ratten zeigen, dass permanente Hippocampusläsionen das soziale Wiedererkennungsgedächtnis bei einem Retentionsintervall von 30 min nicht beeinträchtigen (Bannerman et al. 2001, Squires et al. 2006). Diese Diskrepanz lässt sich auch mit den Befunden der vorliegenden Arbeit nicht erklären und bedarf weiterer, detaillierter Untersuchungen. Möglicherweise wird die Größe der Läsion insbesondere mit Blick auf den die mögliche Beteiligung von dorsalem versus ventralen Hippocampus häufig kaum beachtet (vgl. auch die Diskussion weiter unten).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass zum Zeitpunkt der Aquisition der olfaktorischen Information der dorsale Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Prozessierung der relevanten Informationen für die Generierung eines sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses bei Mäusen zu spielen scheint. Die Frage, ob der dorsale Hippocampus auch bei der Konsolidierung und/oder beim Wiederabrufen von Informationen beteiligt ist, wurde in der Arbeit von Daumas und Kollegen (2005) untersucht. Dabei ging es jedoch um die Beteiligung einzelner Strukturen des dorsalen Hippocampus bei der kontextabhängigen Furchtkonditionierung. Lidocain wurde zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Gedächtnisbildung (Aquisition, Konsolidierung, Abrufen) lokal in verschiedene Teile des Hippocampus injiziert und die Zeitdauer von Furchtantwort in der entsprechenden Umgebung gemessen. Die Autoren beschreiben, dass die CA1- und CA3-Regionen des dorsalen Hippocampus sowohl bei der Aufnahme als auch bei der Konsolidierung der Information beteiligt sind, das Wiederabrufen dieser

Information jedoch unabhängig vom Hippocampus funktioniert (Daumas et al. 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Beteiligung des dorsalen Hippocampus beim Wiederabrufen der olfaktorischen Information untersucht. Da es nach der Injektion von Anisomycin drei Stunden vor dem *Choice* zu keiner Störung der sozialen Diskrimination im *Choice* kam, ist davon auszugehen, dass Proteinbiosyntheseprozesse im dorsalen Hippocampus nicht in das Wiederabrufen der olfaktorischen Information einbezogen sind. Der Effekt der NaCl-Lösung kann, wie von Noack (2012) detailliert ausgeführt und oben schon im Zusammenhang mit der Lidocain-Injektion diskutiert, auf eine Verhaltensmodulation durch die mutmaßliche Störung des extrazellulären Milieus erklärt werden.

In der Arbeit von Richter und Kollegen (2005) wurde die c-Fos-Synthese zu unterschiedlichen Zeitpunkten der olfaktorischen Gedächtnisbildung in verschiedenen Hirnarealen analysiert. Dabei konnte eine vermehrte Anzahl c-Fos-positiver Zellkerne nach einem *Sampling* im *Bulbus olfactorius*, in der medialen preoptischen Area, in den NAME sowie im piriformen Kortex festgestellt werden. Die vermehrte Anzahl c-Fos-positiver Zellkerne war dabei bis zu zwei Stunden nach der Aufnahme der olfaktorischen Information messbar und sank nach etwa vier Stunden wieder auf den Ausgangswert (Richter et al. 2005). Unklar ist jedoch, warum in dieser Publikation im dorsalen Hippocampus, der – laut Literatur (Kogan et al. 2000) - an der olfaktorischen Gedächtnisbildung wesentlich beteiligt ist und in dem - nach den hier vorgelegten Ergebnissen - die *De-novo*-Proteinbiosynthese eine essentielle Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung zu spielen scheint, nach dem *Sampling* keine signifikante Induktion der c-Fos-Synthese gemessen werden konnte. C-Fos ist ein Transkriptionsfaktor, welcher kurz nach der Stimulation einer Zelle von den sogenannten *immediate early genes* transkribiert wird. Die Synthese dieses Proteins ist messbar und zeigt die zelluläre Aktivität in entsprechenden Hirnregionen nach einer Stimulation an. Wenn also die Bildung des Langzeit-Gedächtnisses auf *De-novo*-Proteinbiosynthese beruht, könnte auch ein Anstieg der c-Fos-Aktivität in den beteiligten Hirnregionen zu messen sein. Möglicherweise sind aber auch andere Transkriptionsfaktoren an der Konsolidierung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses beteiligt. Zudem sollten genauere und intensivere Analysen der c-Fos-Synthese in den verschiedenen Anteilen des Hippocampus (dorsal versus ventral) einen genaueren Einblick in subtile Änderungen ermöglichen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit regen zu solchen Untersuchungen an.

Da aufgrund der hier mittels lokaler Anisomycin-Injektion gewonnenen Ergebnisse von einer Beteiligung des dorsalen Hippocampus an der Konsolidierung des olfaktorischen Langzeit-Gedächtnisses ausgegangen werden kann, bei Richter und Kollegen (2005) jedoch während der Informationsaufnahme keine Induktion der c-Fos-Synthese im dorsalen Hippocampus beobachtet wurde, müssen auch mögliche andere Mechanismen der Anisomycin-Wirkung ins Auge gefasst werden. In der Arbeit von Canal und Kollegen (2007) wurde beschrieben, dass die lokale Applikation von Anisomycin zur Freisetzung der biogenen Amine Norepinephrin (NE), Dopamin (DA) und Serotonin führt. Die Autoren haben in dieser Arbeit die Wirkung des Anisomycins auf das inhibitorische Vermeidungslernen bei Ratten untersucht und dabei festgestellt, dass es kurz nach der lokalen Applikation von Anisomycin in die Amygdala zur Freisetzung von NE, DA und Serotonin weit über das normale Niveau hinaus kommt. Danach sinken die lokalen Konzentrationen von NE und DA über mehrere Stunden wieder ab und erreichen erst nach 48 Stunden wieder ihre Basalwerte. Dies lässt vermuten, dass durch die Applikation von Anisomycin der Neurotransmitterhaushalt in der Amygdala und damit auch die Prozessierung der Information gestört wurde. Zur Erhärtung dieser Hypothese wurden gemeinsam mit Anisomycin Betarezeptorantagonisten oder –agonisten injiziert, die der Wirkung des NE durch Rezeptorblockade entgegenwirken sollten. Durch die zusätzlichen Substanzen konnte die durch Anisomycin bewirkte Gedächtnisstörung gemildert werden. Auch die alleinige Applikation von NE in die Amygdala führte zu einer der Anisomycin-Behandlung gleichsinnigen Störung der Gedächtnisfunktion. Die hemmende Wirkung des Anisomycins auf die Langzeit-Gedächtnisbildung scheint somit nicht allein durch Hemmung der Proteinbiosynthese erklärbar zu sein. Vielmehr führen intraparenchymale Injektionen von Anisomycin zu einer veränderten Ausschüttung der o.g. Neurotransmitter. Ob und inwieweit derartige Effekte zu den hier berichteten Ergebnissen beigetragen haben, kann nicht sicher beantwortet werden. Offensichtlich aber müssen bei allen intrazerebralen Injektionen von Anisomycin bei der Ergebnisinterpretation direkte Einflüsse auf die lokale Neurotransmitterfreisetzung berücksichtigt werden.

Zusätzlich zu den beschriebenen Nebenwirkungen von Anisomycin bezüglich Neurotransmitterfreisetzung stellt sich auch die Frage nach der Größe des durch die Injektion von Anisomycin beeinflussten Hirnareals. Wanisch & Wotjak (2008)

untersuchten die Ausdehnung der Hemmung der Inkorporation radioaktiv markierter Aminosäuren in das Hirngewebe nach Applikation von Anisomycin in den dorsalen Hippocampus. Dabei stellten die beiden Autoren fest, dass eine Dosis von Anisomycin, die der hier eingesetzten entspricht, die Aminosäureinkorporation nicht nur in den dorsalen Hippocampus hemmt, sondern zwischen 0,5 und 3 Stunden *post iniektionem* auch die Aufnahme in Teile des ventralen Hippocampus stört. Das provoziert einen Blick zurück auf die eingangs erwähnte differenzierte Betrachtung der Konsequenzen der Informationsverarbeitung im dorsalen *versus* ventralen Hippocampus (Fanselow & Dong 2010) und stellt für Anisomycin, vermutlich aber nicht für Lidocain (siehe oben), die sichere Begrenzung der Behandlung auf den dorsalen *versus* ventralen Hippocampus infrage. Es wird vermutet, dass im dorsalen Hippocampus vor allem ein zeitlich-räumlicher Kontext hergestellt (Wallenstein et al. 1998) und ‚Kategorien‘ erzeugt werden (Vann & Albasser 2011), wohingegen der ventrale Anteil durch die Generierung von Emotionen stärker in die durch Motivation kontrollierte motorische Aktivität einbezogen ist (Bannerman et al. 2003, Calfa et al. 2007). Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die in den anderen Studien beobachteten Effekte (Kogan et al. 2000) möglicherweise auf die implizite Läsion des ventralen Hippocampus und – wenn überhaupt – nur zu einem geringen Maße dorsalen Hippocampus zurückzuführen sind, weil die soziale Diskrimination vermutlich monomodal codiert ist, mithin keine komplexen Kategorien aus polymodalen Stimuli gebildet werden müssen (Engelmann 2008). Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, ähnliche Untersuchungen durchzuführen, bei denen insbesondere der ventrale Hippocampus das Ziel der Manipulationen darstellen sollte. In jedem Falle aber liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Grundstein für die weitere Untersuchung der Bedeutung des (dorsalen) Hippocampus bei der weiteren Erforschung des sozialen, olfaktorischen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses bei Mäusen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung des dorsalen Hippocampus für die olfaktorische Langzeit-Gedächtnisbildung zu untersuchen. Dabei interessierte zum einen die Frage, zu welchem Zeitpunkt (Aquisition und/oder Konsolidierung und/oder Abrufen) im dorsalen Hippocampus die olfaktorische Gedächtnisbildung beeinflusst wird. Zum anderen war von Interesse, durch welchen neuronalen Mechanismus selbiges bewirkt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Manipulationen des dorsalen Hippocampus zu Verhaltensänderungen in dem hier verwendeten Test auf soziale Diskrimination führen. Die Applikation von NaCl- und Ringerlösung, welche eigentlich als Kontrollsubstanzen dienen sollten, führte sowohl zum Zeitpunkt der Informationsaufnahme (Lernen) als auch beim Wiederabrufen der Information zu einem Verlust der sozialen Diskriminationsfähigkeit. Demgegenüber konnte durch Zugabe des in NaCl gelösten Lokalanästhetikums Lidocain unmittelbar vor dem Lernen der störende Effekt aufgehoben werden.

Die Applikation von Anisomycin in den dorsalen Hippocampus störte die Konsolidierung, nicht aber das Abrufen des Langzeit-Gedächtnisses, was wir zunächst so interpretierten: Für eine erfolgreiche soziale Diskrimination muss im dorsalen Hippocampus die *De-novo*-Proteinbiosynthese, die spätestens drei Stunden vor dem Abrufen beendet ist, nach Lernen stattgefunden haben.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von anderen Autoren gehen wir aktuell davon aus, dass für die Bildung des Langzeit-Gedächtnisses nicht wie bisher angenommen allein der dorsale Hippocampus verantwortlich ist, sondern dass dem ventralen Hippocampus eine entscheidende Bedeutung bei der Konsolidierung und/oder dem Abrufen des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses zukommt.



## 6 Literatur

- BANNERMAN D.M., GRUBB M., DEACON R.M.J., YEE B.K., FELDON J. & RAWLINS J.N.P. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav. Brain Res.* 139, 197-213.
- BANNERMAN D.M., LEMAIRE M., BEGGS S., RAWLINS J.N.P. & IVERSEN S.D. (2001). Cytotoxic lesions of the hippocampus increase social investigation but do not impair social-recognition memory. *Exp. Brain Res.* 138, 100-109.
- BROWN M.W. & AGGLETON J.P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 51-61.
- BUNSEY M. & EICHENBAUM H. (1995). Selective Damage to the Hippocampal Region Blocks Long-Term Retention of a Natural and Nonspatial Stimulus-Stimulus Association. *Hippocampus* 5, 546-556.
- CALFA G., BUSSOLINO D. & MOLINA V.A. (2007). Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: Role of glucocorticoid receptors. *Behav. Brain Res.* 181, 23-34.
- CANAL C.E., CHANG Q. & GOLD P.E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 12500-12505.
- DAUMAS S., HALLEY H. & FRANCES B. (2005). Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn. Mem.* 12, 375-382.
- DOUGLAS R.J. (1967). The hippocampus and behavior. *Psychol. Bull.* 67, 416-442.
- EICHENBAUM H., FAGAN A. & COHEN N.J. (1986). Normal olfactory discrimination learning set and facilitation of reversal learning after medial-temporal damage in rats: Implications for an account of preserved learning abilities in amnesia. *J. Neurosci.* 6, 1876-1884.
- EICHENBAUM H., SCHOENBAUM G., YOUNG B. & BUNSEY M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13500-13507.
- ENGELMANN M. (2009). Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 58-65.
- ENGELMANN M. (2008). Vasopressin in the septum: Not important versus causally involved in learning and memory. Two faces of the same coin? *Prog. Brain Res.* 170, 389-395.
- ENGELMANN M., WOTJAK C.T. & LANDGRAF R. (1995). Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol. Behav.* 58, 315-321.

- ENGELMANN, M., HÄDICKE, J. & NOACK, J. (2011). Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the non-conditioned social discrimination procedure. *Nat. Protoc.* 6, 1152-1162.
- FANSELOW M.S. & DONG H. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.
- FRANKLIN K.B.J, & PAXINOS G. (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates, San Diego, Academic Press.
- HÄDICKE, J. (2013). Zum Einfluss des Genotyps und des Geschlechts auf ausgewählte Verhaltensparameter einschließlich des sozio-olfaktorischen Langzeitwiedererkennungsgedächtnisses von Mäusen des 129S1/SvImJ-Stammes und 129S1/SvImJ-C57BL/6JOlaHsd-Hybriden Dissertation Universität Magdeburg (<http://edoc2.bibliothek.uni-halle.de/hs/urn/urn:nbn:de:gbv:ma9:1-4378>).
- HOFFMANN G.E., SMITH M.S. & VERBALIS J.G. (1993). C-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 14, 173-213.
- KOGAN J.H., FRANKLAND P.W. & SILVA A.J. (2000). Long term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10, 47-56.
- LAI W., RAMIRO L.R., YU H.A. & JOHNSTON R.E. (2005). Recognition of Familiar Individuals in Golden Hamsters: A New Method and Functional Neuroanatomy. *J. Neurosci.* 25, 11239-11247.
- MALPELI J.G. (1999). Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J. Neurosci. Meth.* 86, 119-128.
- NOACK, J. (2012). Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der Nuclei amygdalae medialis auf das unkonditionierte, soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen. Dissertation Universität Magdeburg (<http://edoc2.bibliothek.uni-halle.de/hs/content/titleinfo/20565>).
- RICHTER K., WOLF G. & ENGELMANN M. (2005). Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn. Mem.* 12, 407-413.
- ROSS R.S. & EICHENBAUM H. (2006). Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J. Neurosci.* 26, 4852-4859.
- RUDY J.W. (2005). The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 119, 154-163.
- SANCHEZ-ANDRADE G., JAMES B.M. & KENDRICK K.M. (2005). Neural encoding of olfactory recognition memory. *J. Reprod. Dev.* 51, 547-558.

- SCOVILLE W.B. & MILNER B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 20, 11-21.
- SQUIRES A.S., PEDDLE R., MILWAY S.J. & HARLEY C.W. (2006). Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85, 95-101.
- THOR D.H. & HOLLOWAY W.R. (1982). Social Memory of the Male Laboratory Rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 1000-1006.
- VANN S.D. & ALBASSER M.M. (2011). Hippocampus and neocortex: Recognition and spatial memory. *Curr. Opin Neurobiol.* 21, 440-445.
- WALLENSTEIN G.V., EICHENBAUM H. & HASSELMO M.E. (1998). The Hippocampus as an associator of distinguishable events. *Trends Neurosci.* 21, 317-323.
- WANISCH K. & WOTJAK C.T. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 485-494.
- WANISCH K., WOTJAK C.T. & ENGELMANN M. (2008). Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behav. Brain Res.* 186 (2008) 191-196.

## 7 Anhang

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Chemikalien

Substanz	Wirkstoff / Inhaltsstoff	Firma
Anisomycin 97%	Anisomycin (from streptomyces geseolus)	Sigma Aldrich, Steinheim
DePeX	Xylol (Isomerengemisch) 60-80% Dibutylphthalat 2,5-7%	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
<u>Färbung nach Nissl:</u> 1 min Certistain 20 sec 70% Alkohol 20 sec 96% Alkohol 5 min Isopropanol >99,9% 5 min Xylene	Kresylviolett (Acetat) Ethanol Ethanol 2-Propanol Xylene	Merck Zentralapotheke Magdeburg Zentralapotheke Magdeburg Carl Roth GmbH VWR Prolabo
Histoacryl	n-Butyl-2-Cyanacrylat	Braun Aesulap, Tuttlingen
Isofluran	Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% (Kontrollsubstanz)	<u>1000 ml enthalten:</u>  NaCl 9,0g  Wasser für Injektionszwecke  Theoretische Osmolarität 308 mOsm/l  Titrationsacidität (pH 7,4) < 0,3 mmol/l  pH-Wert 4,5-7,0  <b>Elektrolyte mmol/l</b>  Natrium           154  Clorid            154	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketavet (100mg/ml)	Ketaminhydrochlorid	Pfizer Pharmacia, Berlin
Lidocain 2%	Xylocitin	Mibe Vertriebsgesellschaft GmbH, Jena
Metacam (5mg/ml)	Meloxicam	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim
Refobacin-Creme	Gentamicin sulfat	Almirall Hermal GmbH, Reinbek
Rompun (2%)	Xylazinhydrochlorid	Bayer Vital GmbH,

		Leverkusen
Wasserstoffperoxid (3%)	Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	Merck KGaA, Darmstadt

### 7.1.2 Puffer, Lösungen

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
Isofluran-Inhalationsnarkose	2 % Isofluran 100 % Sauerstoff
Lösung für eine tiefe Narkose	2 ml Ketavet® 0,5 ml Rompun® 7,5 ml NaCl-Lösung
Metacam®-Lösung (0,5 mg/kg Körpergewicht)	0,05 ml Metacam® (0,25 mg Meloxicam) 4 ml NaCl-Lösung

### 7.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör

Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör	Hersteller, Bezugsquelle
Augengel (Vidisc)	Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Augenstäbchen (Pro-Ophta®)	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Regensburg
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Dual® Cement (Zahnzement)	Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Edding (30, geruchsneutral)	Edding International GmbH, Ahrensburg
Einstreu	J. Rettenmayer & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg
Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Führungskanüle (0,55 X 0,08 X 9,00 mm)	Injecta GmbH, Klingenthal
Injektionskanüle (0,36 X 0,08 X 20,00 mm)	Injecta GmbH, Klingenthal
Insektennadeln (Stärke 0)	Ento Sphinx s.r.o., Pardubitz, Tschechische Republik
Isofluranverdampfer (Isotec 4)	Datex Ohmeda GmbH, Duisburg
Kanüle (23 G)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Kaltlichtquelle	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Kryomikrotom (Leica CM3050 S)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kunststoffschlauch (Tygon®R3607, Innendurchmesser: 0,19 mm Wandstärke: 0,91 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroinjektionspumpe	CMA Microdialysis AB, Stockholm, Schweden
Narkosegerät (MLW Medimorph System)	VEB MLW, Leipzig
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Schrauben (DIN 84, 1,0 X 2,0 mm)	Paul Korth GmbH & Co. KG, Lüdenscheidt
Skalpellklingen (Feather No. 11)	Pfm Medical AG, Köln
Spritzen	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stieltupfer (Raucotupf)	Lohmann & Rauscher International
SuperFrost® Plus-Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Typ II Käfig (Makrolon®, 22 X 16 X 14 cm) Versuchskäfig	E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Typ III Käfig (Makrolon®, 37 X 21 X 15 cm) Heimkäfig	E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Zahnbohrer	VEB MLW Dentalfabrik, Treffurt

### 7.1.4 Computerprogramme

Programme	Hersteller
Axio Imager.M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
AxioVision Rel.4.7 (08-2008)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
EVENTLOG event recorder, Version 1.0, 1986	Robert Henderson
Excel	Microsoft
WinRat (Version 2.30, 1995)	Copyright © by Dr.-Ing. H. Barthelmes, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

## 7.2 Tabellen

### 7.2.1 Darstellung der Untersuchungszeiten für die einzelnen Versuche

Versuche	Untersuchungszeiten während des Samplings [s]	
	MW	SFM
vor Op	60,32	3,52
nach Op	50,49	3,79
Injektion von NaCl-Lösung unmittelbar vor dem Sampling	29,3	7,62
Injektion von Lidocain unmittelbar vor dem Sampling	52,01	13,00
Injektion von Ringer-Lösung unmittelbar vor dem Sampling	79,73	11,76
Injektion von Anisomycin unmittelbar vor dem Sampling	63,79	7,00
Ohne Injektion nach mindestens einer stattgehabten Injektion	29,49	3,30
Injektion von NaCl-Lösung 3 Stunden vor Sampling	24,51	3,59
Injektion von Anisomycin 3 Stunden vor Sampling	38,43	5,27
Injektion von NaCl-Lösung 3 Stunden vor Choice	83,53	11,69
Injektion von Anisomycin 3 Stunden vor Choice	72,69	12,40

## DANKSAGUNGEN

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit möchte ich mich herzlich bei denjenigen bedanken, die wesentlich zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Mario Engelmann, der es mir zunächst einmal ermöglicht hat, am (ehemaligen) Institut für Medizinische Neurobiologie (heute Institut für Biochemie und Zellbiologie) eine Dissertationsarbeit zu beginnen und mich für das Thema Hippocampus und soziales Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen begeistern konnte. Durch zahlreiche Gespräche und Anregungen hat er mich an das wissenschaftliche Denken und Arbeiten herangeführt, wovon ich sicherlich auch in meiner weiteren Laufbahn als Ärztin profitieren werde. Auch für seine Geduld und die schnellen Korrekturen möchte ich mich hiermit besonders bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Neurobiologie für die freundliche Aufnahme und das stets harmonische Arbeitsklima. Bei Rita Murau möchte ich mich besonders bedanken für die sehr gewissenhafte Hilfe bei den Laborarbeiten, insbesondere beim Aufbau der Versuche.

Ein großer Dank gilt auch Julia Noack, die zur selben Zeit als Biologie-Doktorandin ein ähnliches Thema bearbeitet hat und mir nicht nur bei allen wissenschaftlichen Fragen stets mit Rat und Tat beiseite stand, sondern mir während der gesamten Zeit auch eine gute Freundin geworden ist.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei den beiden Menschen bedanken, die mir schon in der Kindheit die Welt der Wissenschaften gezeigt, meine Begeisterung hierfür gespürt und mir den Weg dahin geebnet haben – meinen Eltern, Cornelia und Manfred Teichert. Ihnen gilt mein größter Respekt und Anerkennung dafür, dass sie stets an mich glauben, mir in allen Lebenslagen unterstützend zur Seite stehen und mir ihre bedingungslose Liebe zukommen lassen.



## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der dorsalen Hippocampi auf das unkonditionierte, soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen**

im Institut für Biochemie und Zellbiologie

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Mario Engelmann

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 03.11.2014

Monique Radscheidt

## Darstellung des Bildungsweges

1991 – 1995	Grundschule, Stendal
1995 – 2004	Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, Stendal  Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
2004 – 2011	Studium der Humanmedizin an der Otto- von-Guericke Universität in Magdeburg,  Approbation
Seit Juni 2011	Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums in Jena

Magdeburg, den 03.11.2014

Monique Radscheidt